



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ  
ΗΠΑΡΙΝΩΝ, ΣΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ  
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ, ΣΕ  
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΠΟΥ  
ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΕΚΤΟΜΗ**

**ΚΟΛΙΟΥ Ν. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ**  
Βιοχημικός – Ιατρός, BS, MSc, MD

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ  
ΗΠΑΡΙΝΩΝ, ΣΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ  
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ, ΣΕ  
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΠΟΥ  
ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΕΚΤΟΜΗ**

**ΚΟΛΙΟΥ Ν. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ**  
Βιοχημικός – Ιατρός, BS, MSc, MD

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.»



**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ Ν. ΚΟΛΙΟΥ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ-ΙΑΤΡΟΥ, BS, MSc, MD**

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή, που διορίστηκε για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του κ. Π.Ν. ΚΟΛΙΟΥ, με την υπ' αριθμ. 926/06-06-2016, συνήλθε σήμερα στις 07 Ιουλίου 2016 και ώρα 12:00 στην αίθουσα Συνεδριάσεων του Τμήματος Χημείας του Τμήματος Χημείας και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής του υποψήφιου με τίτλο:

**« Η επίδραση των μικρού μοριακού βάρους ηπαρινών, σε βιοχημικούς δείκτες της αγγειογένεσης και τον μηχανισμό της πήξης, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέους εντέρου που υποβάλλονται σε θεραπευτική εκτομή »**

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής υπέβαλλαν ερωτήσεις προς τον υποψήφιο τόσο γενικού περιεχομένου όσο και σχετικές με το θέμα της διατριβής. Στη συνέχεια και μετά την αποχώρηση του ακροατηρίου και του υποψήφιου ακολούθησε διεξοδική συζήτηση μεταξύ των μελών της επιτροπής.

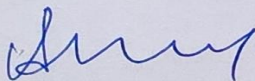
Τα μέλη της επιτροπής δήλωσαν ότι **έμειναν απόλυτα ικανοποιημένοι από την προφορική παρουσίαση καθώς και τον όγκο και ποιότητα της ερευνητικής εργασίας.**

Η επιτροπή μετά από ψηφοφορία έκρινε **ομόφωνα** ότι η διατριβή του κ. Παναγιώτη Ν. Κολιού παρουσιάζει εξαιρετική πρωτοτυπία και ότι αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη.

Μετά από αυτά απεφάσισε **ομόφωνα** να εγκρίνει τη διατριβή με τον βαθμό **ΑΡΙΣΤΑ (10)**

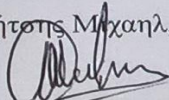
Ιωάννινα 07-07-2016

Η Επταμελής Επιτροπή

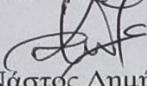


Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αναπλ. Καθηγήτρια, Χημικό Τμήμα, Επιβλέπουσα

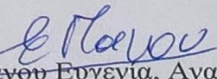
Μήτσιος Μιχαήλ, Αναπλ. Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, μέλος της Τριμ. Επιτροπής



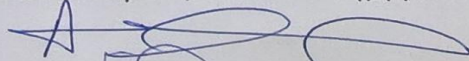
Φατούρος Μιχαήλ, Ομότιμος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, μέλος της Τριμ. Επιτροπής



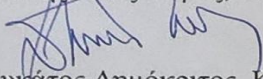
Νάστος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική σχολή



Πάνου Ευγενία, Αναπλ. Καθηγήτρια, Χημικό Τμήμα



Τσελέπας Αλέξανδρος, Καθηγητής, Χημικό Τμήμα



Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής, Χημικό Τμήμα





**Στους γονείς μου Νικόλαο και Χαριστούλα για την αέναη υποστήριξη**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κλινική μελέτη που έγινε στα πλαίσια της Διδακτορικής μου Διατριβής, αφορούσε σε ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο του παχέος εντέρου. Χωρίς την εθελοντική συμμετοχή τους, κατόπιν πλήρους και διεξοδικής ενημέρωσής τους, η εκπόνησή της θα ήταν αδύνατη. Οφείλω λοιπόν, να τους εκφράσω δημόσια την ευγνωμοσύνη μου για την αποδοχή της συμμετοχής τους.

Η μελέτη αυτή δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί, χωρίς τη βοήθεια και την καθοδήγηση, που μου προσέφερε, ως αρχικός επιβλέπων, ο αείμνηστος Καθηγητής Κωνσταντίνος Δραΐνας. Λόγω της οδυνηρής απώλειάς του, ήταν αναγκαία η αντικατάστασή του και ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κα Ειρήνη - Άννα Κούκκου, που αποδέχτηκε τον ορισμό της ως επιβλέπουσα, όπως και τα δύο άλλα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητές κ.κ. Μιχαήλ Φατούρο και Μιχαήλ Μήτση. Χωρίς την βοήθειά τους, στο σχεδιασμό της μελέτης, στην προσπάθεια ένταξης ασθενών σε αυτήν, την υποστήριξη σε θέματα υποδομών και κάλυψης του οικονομικού κόστους, όπως επίσης και σε ζητήματα που αφορούσαν στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στην εξαγωγή κλινικών συμπερασμάτων, η εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής αυτής, δεν θα ήταν εφικτή.

Η μελέτη, υποστηρίχθηκε εργαστηριακά από το Αιματολογικό τμήμα και το Τμήμα Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Όλη η εργαστηριακή εργασία (διαχωρισμός, αποθήκευση και έλεγχος των δειγμάτων) έγινε με την καθοδήγηση των δυο υπεύθυνων των Τμημάτων αυτών, κ.κ. Νικόλαου Κολαΐτη και Γεώργιου Βαρθολομάτου. Αισθάνομαι λοιπόν την ανάγκη, να ευχαριστήσω εκ βαθέων, τον Διευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ι. κ. Νικόλαο Κολαΐτη, όχι μόνο για τον ατέλειωτο χρόνο και τις γνώσεις που μου προσέφερε, αλλά κυρίως για τον καταλυτικό τρόπο που επέδρασε στην εν γένει επιστημονική μου εξέλιξη. Η βοήθειά του, για την από μέρους μου κατανόηση και εμβάθυνση σε διάφορα πεδία και εργαστηριακές τεχνικές και ιδιαίτερα στους τομείς και στους μηχανισμούς της πρωτογενούς και δευτερογενούς αιμόστασης, όπως και της επιστήμης της στατιστικής, ήταν καθοριστική. Επίσης, θερμές ευχαριστίες οφείλω στον υπεύθυνο του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας του Π.Γ.Ν.Ι. κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, για την εξίσου σημαντική υποστήριξή του, σε ό,τι σχετίζονταν με τεχνικές γενετικής ανάλυσης και Μοριακής Βιολογίας των διαφόρων δειγμάτων. Οι ατέλειωτες ώρες εργαστηριακής δουλειάς που μου αφιέρωσε, καθώς και η καθοδήγησή του, αποτέλεσαν ανεκτίμητη για μένα βοήθεια, αλλά και οδηγό για την ερευνητική και γενικότερα επιστημονική μου αντίληψη.

Τέλος, θα πρέπει να τονίσω, πως η Διδακτορική αυτή Διατριβή προέκυψε έπειτα από αμέτρητες ώρες συζητήσεων και προβληματισμών, γύρω από ζητήματα που αφορούσαν την πιθανή

σύνδεση των μηχανισμών καρκινογένεσης και των διαταραχών του πηκτικού μηχανισμού, με τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μιχαήλ Μήτση. Η γνωστή από την εποχή του Armaund Trousseau, υπόθεση αυτή, νεότερα ερευνητικά δεδομένα και επί το πλείστον εμπειρικά κλινικά δεδομένα, μας οδήγησαν στη σκέψη, πως εφόσον αποδεχόμαστε κάποιου βαθμού συσχέτιση των παραπάνω καταστάσεων, είναι λογικό να υποθέσουμε, πως προσπάθειες επηρεασμού της μιας κατάστασης, θα πρέπει να αντανakλούν στην άλλη.

Ο κ. Μιχαήλ Μήτσης, αποτέλεσε τον βασικό ακαδημαϊκό και επιστημονικό καθοδηγητή μου, καθ' όλη τη διάρκεια των ετών που εργαστήκαμε μαζί, αλλά και κατά τα επόμενα έτη των προσπαθειών ανάλυσης και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής και κυρίως της εξαγωγής κλινικών συμπερασμάτων. Τον ευχαριστώ θερμά, για την εμπιστοσύνη, την υποστήριξη, τον πολύτιμο χρόνο και τις προσπάθειές του για οικονομική ενίσχυση, σε όλα τα στάδια της εξέλιξης της μελέτης. Εύχομαι δε ειλικρινά, πολλοί ακόμη φοιτητές και απόφοιτοι του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων να έχουν την αντίστοιχη τύχη της επιστημονικής συνεργασίας μαζί του.

*Κολιού Παναγιώτης*

*Ιωάννινα 2016*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου (VEGF-A) είναι ένας ισχυρός ρυθμιστής της αγγειογένεσης και επιπλέον πιθανά έχει προγνωστική αξία σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Στους ασθενείς αυτούς, οι μικρού μοριακού βάρους ηπαρίνες (LMWH), ενδείκνυνται για την περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη.

**ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:** Στόχος της μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης διαφορετικών δόσεων και διαφορετικής χρονικής διάρκειας χορήγησης της τινζαπαρίνης, στα περιεγχειρητικά επίπεδα του VEGF-A, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου που υποβλήθηκαν σε θεραπευτική εκτομή (R0).

**ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ:** Στη μελέτη τυχαιοποιήθηκαν 76 ασθενείς, από τους οποίους τελικά, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε 59, που αποτέλεσαν τον πληθυσμό των 4 ομάδων μελέτης. Στις ομάδες I και II, οι ασθενείς έλαβαν περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη με τινζαπαρίνη, 3.500 IU, μια φορά την ημέρα, για 10 και 30 ημέρες, αντίστοιχα. Στις ομάδες III και IV, οι ασθενείς έλαβαν 4.500 IU τινζαπαρίνης, για αντίστοιχες χρονικές περιόδους. Αιμοληψίες, για εκτίμηση των επιπέδων VEGF και ενεργότητας της πρωτεΐνης C, αντιθρομβίνης III (ATIII) και του παράγοντα VIII, ελήφθησαν στις κάτωθι ημέρες: προεγχειρητικά (pre-op), τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day) και την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (30<sup>th</sup> post-op day). Γενετική ανάλυση για γονιδιακές μεταλλάξεις σχετιζόμενες με θρομβοφιλία έγιναν με PCR. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, έγινε με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μικτού σχεδιασμού ANOVA (SPSS v21, Inc, Chicago, Ill).

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Οι ασθενείς όλων των ομάδων έδειξαν αύξηση των επιπέδων VEGF την 10<sup>th</sup> post-op day, σε σχέση με την pre-op day. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική στις ομάδες I, II και IV ( $p=0.008$ ,  $p=0.017$  και  $p=0.000$ , αντίστοιχα). Οι ασθενείς των ομάδων I και III (βραχεία διάρκεια θρομβοπροφύλαξης) είχαν, κατά την 30<sup>th</sup> post-op day, υψηλότερα επίπεδα VEGF, σε σχέση με τα αντίστοιχα των ασθενών με μακράς διάρκειας θρομβοπροφύλαξη, δηλαδή των ομάδων II και IV ( $p=0.000$ ). Το αποτέλεσμα αυτό οφείλονταν κυρίως στα επίπεδα της ομάδας IV, οι ασθενείς της οποίας ήταν οι μόνοι των οποίων τα επίπεδα VEGF κατά την 30<sup>th</sup> post-op day, δεν διέφεραν από αυτά της pre-op day. Επιπλέον, η υψηλή δόση τινζαπαρίνης, για μακρά διάρκεια χορήγησης, έχει ως αποτέλεσμα συνολικά την αποτελεσματικότερη ρύθμιση του συστήματος πήξης, μέσω ρύθμισης της διακύμανσης των επιπέδων ενεργότητας των πρωτεϊνών ATIII, C και του παράγοντα VIII.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Η περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, με δόση LMWH 4.500 IU για 30 ημέρες, έχει ως αποτέλεσμα την ομαλοποίηση των

διακυμάνσεων των επιπέδων του VEGF, κατά τη μετεγχειρητική περίοδο, έτσι ώστε αυτά την 30<sup>th</sup> post-op day να μη διαφέρουν από τα αντίστοιχα της pre-op day και ταυτόχρονα την αποτελεσματικότερη ρύθμιση παραγόντων του μηχανισμού πήξης.

## SUMMARY

**BACKGROUND:** The vascular endothelial growth factor (VEGF-A) is a potent regulator of angiogenesis and most likely has a prognostic value in patients with colon cancer. In these patients, low molecular weight heparins (LMWH), are indicated for the perioperative thromboprophylaxis.

**AIM OF THE STUDY:** The main goal of the study was to evaluate the impact of the usage of different doses (3.500 IU vs. 4.500 IU) and/or different time periods (10 vs. 30 days) of a specific LMWH (tinzaparin), for perioperative thromboprophylaxis, upon the perioperative levels of serum VEGF, in colon cancer patients who underwent planned to have curative tumor resection (R0).

**MATERIALS & METHODS:** 76 consecutive colon cancer patients were initially randomized and the results of 59, who conducted the four study groups, were finally analyzed. In groups I and II, the patients received 3.500 IU of tinzaparin once per day for 10 and 30 days accordingly. In groups III and IV, the patients received 4.500 IU of tinzaparin once per day for the same time-periods. Blood samples for the evaluation of serum VEGF levels and the activities of protein C, Antithrombin III (ATIII) and coagulation factor VIII (FVIII) were obtained at the following days: pre-op, 10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> post-op day. Genetic analysis for thrombophilic gene mutations were performed by PCR. Statistical analysis of the results was done using repeated measurements in mixed desing ANOVA (SPSS v21, Inc. Chicago, Ill).

**RESULTS:** With regard to the main study groups (group I to IV), all patients showed a constant increase in VEGF-A levels at the 10th post-op day, compared to the pre-op day. This increase was statistically significant in groups I, II and IV ( $p=0.008$ ,  $p=0.017$ ,  $p=0.000$  accordingly). Patients of groups I and II (short duration thromboprophylaxis) showed increased serum VEGF-A levels at 30<sup>th</sup> post-op day, compared to that of patients with extended duration thromboprophylaxis (groups II and IV -  $p=0.000$ ). This result was mainly due to the effect of group IV in which the serum VEGF levels at the 30<sup>th</sup> post-op day were comparable to the pre-op levels. Additionally, the higher dose of tinzaparin administered for the extended period, was the most effective in regulating the coagulation cascade. This regulation was achieved through a better regulation of fluctuation of the activity levels of proteins C, ATIII, FVIII.

**CONCLUSIONS:** In colon cancer patients the perioperative thromboprophylaxis with LMWH 4.500 IU for 30 days results in regulation of the variations of serum VEGF levels during the post operative period. At the 30<sup>th</sup> post-op day these levels are similar to that preoperatively. Simultaneously this thromboprophylaxis scheme regulates more effectively the coagulation cascade proteins.





## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>HNPCC</b>	Οικογενής μη πολυποδιασικός ορθοκολικός καρκίνος
<b>FAP</b>	Οικογενής αδενωμάτωσης πολυποδίαση
<b>TNM</b>	Σύστημα σταδιοποίησης Tissue – Node – Μετάσταση
<b>MSI - H, -L</b>	Μικροδορυφορική αστάθεια -Υψηλή, -Χαμηλή
<b>APC</b>	Σύνδρομο αδενωμάτωσης πολυποδίασης εντέρου
<b>CEA</b>	Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο
<b>VEGF-A, B, C, D</b>	Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου -A, -B, -C, -D
<b>LMWH</b>	Μικρού μοριακού βάρους ηπαρίνη
<b>VEGF-A (165 aa)</b>	Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου με 165 αμινοξέα
<b>VEGFR-1, -2, -3</b>	Υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου -1, -2, -3
<b>FGF</b>	Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
<b>TGF</b>	Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης
<b>PDGF</b>	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
<b>TF</b>	Ιστικός παράγοντας
<b>TFPI</b>	Αναστολέας του μονοπατιού του ιστικού παράγοντα
<b>CDX2</b>	Caudal-type homeobox gene 2
<b>TAG-72</b>	Γλυκοπρωτεΐνη που συσχετίζεται με τους όγκους
<b>PI3K</b>	Κινάση της φωσφοινοσιτόλης-3
<b>MAP κινάσες</b>	Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα
<b>PARs</b>	Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες
<b>E-selectin</b>	Μόρια προσκόλλησης που εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα
<b>ICAM-1</b>	Ενδοκυττάριο μόριο προσκόλλησης -1
<b>VCAM</b>	Μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων
<b>TM</b>	Θρομβοτροποποιητίνη
<b>protein C</b>	Πρωτεΐνη C
<b>ATIII</b>	Αντιθρομβίνη III
<b>FVIII</b>	Παράγοντας πήξης FVIII
<b>PAI-1</b>	Ανασταλτής του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
<b>t-, u-PA</b>	Ιστικός και Ουροποιητικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
<b>HGF</b>	Αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων
<b>EGF</b>	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
<b>Ang-1, -2</b>	Αγγειοποιητίνες 1 και 2
<b>IL-8</b>	Ιντερλευκίνη – 8
<b>NO</b>	Μονοξείδιο του αζώτου



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	vii
SUMMARY .....	ix
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	xi
<b>1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Επιδημιολογικά δεδομένα καρκίνου παχέος εντέρου .....	2
1.2 Αιτιοπαθογένεια .....	3
1.2.1 Σύνδρομο HNPCC και άλλες μορφές οικογενούς ορθοκολικού καρκίνου .....	4
1.3 Ιστοχημεία, ανοσοϊστοχημεία και άλλα χαρακτηριστικά .....	5
1.3.1 Μοριακά και γενετικά χαρακτηριστικά .....	6
1.4 Κλινική εικόνα .....	10
1.5 Διάγνωση και αντιμετώπιση .....	11
1.5.1 Ιστολογική διάγνωση και σταδιοποίηση .....	11
1.5.2 Χειρουργική αντιμετώπιση .....	11
1.5.3 Χειρουργικές τεχνικές .....	12
1.5.4 Συμπληρωματική (επικουρική) θεραπεία .....	12
1.5.5 Συμπληρωματική (επικουρική) θεραπεία σταδίου II και III .....	13
1.6 Ιστολογική εκτίμηση όγκου .....	14
1.6.1 Γενικά στοιχεία .....	14
1.6.2 Εκτίμηση ορίων εκτομής .....	14
1.6.3 Εξέταση των λεμφαδένων .....	14
1.6.4 Αναγνώριση φλεβικής διήθησης .....	15
1.6.5 Τομές που πρέπει να ληφθούν .....	15
1.6.6 Ιστολογική έκθεση .....	15
1.7 Αγγειογένεση .....	17
1.7.1 Φυσιολογική αγγειοποίηση και παθολογική αγγειογένεση .....	18

1.7.2 Αγγειογενετικοί παράγοντες .....	18
1.7.3 VEGF-A .....	19
1.7.4 Ισομορφές VEGF και δράσεις τους .....	20
1.7.5 Η οικογένεια των υποδοχέων VPF/VEGF και οι οδοί μεταβίβασης σήματος.....	21
1.7.6 Υποδοχείς του VEGF (VEGFR's) .....	22
1.7.7 Η αγγειογένεση και το σύστημα πήξης.....	23
1.7.8 Η θρομβίνη και ο αγγειογενετικός της ρόλος .....	24
1.7.9 Άλλες αγγειογενετικές πρωτεΐνες.....	26
1.7.10 Αιμοπετάλια και VEGF.....	26
1.8 Ηπαρίνες Μικρού Μοριακού Βάρους (LMWHs).....	28
1.8.1 Ηπαρίνες Μικρού Μοριακού Βάρους και καρκίνος .....	29
<b>2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>32</b>
2.1 Στόχος της μελέτης .....	33
2.2 Υλικό και μέθοδοι.....	33
2.2.1 Κριτήρια ένταξης/αποκλεισμού και έγγραφη συναίνεση.....	33
2.2.2 Σχεδιασμός της μελέτης .....	34
2.2.3 Συλλογή δειγμάτων και αποθήκευση .....	35
2.3 Εργαστηριακές μέθοδοι .....	36
2.3.1 Πρωτεΐνη C.....	36
2.3.2 Αντιθρομβίνη III.....	37
2.3.3 Παράγοντας VIII .....	38
2.3.4 Μεταλλάξεις παράγοντα V (V Leiden), προθρομβίνης (Prothrombin G20210A) και MTHFR, με τη χρήση της ταινίας μεθόδου της Vienna Lab .....	40
Για την ανάπτυξη χρώματος στην ταινίας εξέτασης:.....	43
2.3.5 Επίπεδα VEGF-A 165 .....	44
2.4 Στατιστική Ανάλυση .....	49
2.5 Αποτελέσματα.....	51

2.5.1 Ασθενείς της μελέτης .....	51
2.5.2 Επιδημιολογικά και άλλα χαρακτηριστικά .....	51
2.4.3 Αιματολογικό και βιοχημικό προφίλ.....	53
2.4.4 Αποτελέσματα της ανάλυσης των επιπέδων VEGF στις ομάδες μελέτης .....	55
2.4.5 Ανάλυση επιπέδων VEGF, σε σχέση με ιστοπαθολογικές παραμέτρους .....	64
2.4.5 Αποτελέσματα ανάλυσης των επιπέδων της πρωτεΐνης C .....	67
2.4.6 Αποτελέσματα ανάλυσης επιπέδων αντιθρομβίνης III .....	73
2.4.7 Αποτελέσματα ανάλυσης επιπέδων παράγοντα VIII .....	78
2.5 Συζήτηση.....	81
2.6 Συμπεράσματα .....	85
<b>3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....</b>	<b>88</b>
3.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	89
3.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β .....	93
3.3 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ .....	94
<b>4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>96</b>



# **1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.1 Επιδημιολογικά δεδομένα καρκίνου παχέος εντέρου

Σε χώρες με δυτικού τύπου τρόπο ζωής, περίπου το ήμισυ του συνόλου των θανάτων προκαλούνται από ασθένειες του κυκλοφορικού συστήματος, ενώ το ένα τρίτο περίπου από κάποια μορφή κακοήθειας. Έτσι, ο καρκίνος αποτελεί ένα σημαντικότερο κοινωνικο-οικονομικό πρόβλημα σε παγκόσμιο επίπεδο, ανεξάρτητα από το επίπεδο ανάπτυξης μιας χώρας. Ειδικότερα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα διάγνωσης κακοήθεια, τόσο στους άνδρες, όσο και στις γυναίκες. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EU-27) για το 2012, καταγράφηκαν 447.000 νέα περιστατικά καρκίνου του παχέος εντέρου και 215.000 θάνατοι οφειλόμενοι σε αυτόν<sup>1,2</sup>.

Τα υψηλότερα ποσοστά εντοπίζονται στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, ενώ τα χαμηλότερα στην Αφρική και τη Νότια και Κεντρική Ασία. Τα ποσοστά αυξάνονται επίσης ραγδαία και σε χώρες με ιστορικά χαμηλό κίνδυνο (όπως η Ισπανία), καθώς και σε μια σειρά από χώρες Ανατολικής Ευρώπης και Ασίας<sup>3,4</sup>. Τέτοιες δυσμενείς τάσεις θεωρούνται ότι αντανακλούν ένα συνδυασμό παραγόντων, που περιλαμβάνουν αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες, και μια αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας και του καπνίσματος<sup>3,5,6</sup>.

Οι Ηνωμένες Πολιτείες είναι η μόνη χώρα με σημαντικά μειωμένα ποσοστά εμφάνισης και στα δύο φύλα, πιθανά λόγω της ευρείας εφαρμογής του προσυμπτωματικού ελέγχου, μέσω ενδοσκοπήσεων και της συχνότερης εξαίρεσης προκαρκινικών βλαβών<sup>3,7</sup>. Η εφαρμογή τέτοιων προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου σε πολλές δυτικές χώρες, φαίνεται πως μπορεί να μειώσει δραστικά τη θνητότητα από τον καρκίνου του παχέος εντέρου<sup>7-9</sup>. Επίσης, η τροποποίηση παραγόντων κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η παχυσαρκία και η συχνή κατανάλωση κόκκινου επεξεργασμένου και αλκοόλ, μπορεί να μειώσει τον επιπολασμό του<sup>1,10</sup>. Σύμφωνα με μια πρόσφατη τυχαίοποιημένη μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο, μια και μόνο εξέταση με ευέλικτη σιγμοειδοσκόπηση, σε άτομα μεταξύ 55 και 64 ετών, μπορεί να μειώσει την συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος κατά 33% και την θνησιμότητα κατά 43%<sup>8</sup>.

Στην Ελλάδα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, αποτελεί την τέταρτη κατά σειρά συχνότητας κακοήθεια στους άνδρες και τη δεύτερη στις γυναίκες, (25 και 17,2 νέα περιστατικά/100.000 κατοίκους/έτος, αντίστοιχα) και την τρίτη αιτία θνητότητας στους άνδρες και τη δεύτερη στις γυναίκες (14,9 και 9,9 θάνατοι/100.000/έτος, αντίστοιχα)<sup>2</sup>. Σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρώπη, η χώρα μας είναι στην προτελευταία θέση, από άποψη επιπολασμού και θνητότητας, πράγμα που πιθανά συνδέεται με το μεσογειακό τρόπο ζωής.<sup>9,10</sup>

Από τους 447.000 νεοεμφανιζόμενες ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου στην Ευρώπη το 2012, περίπου το 50-60% υποβλήθηκαν σε R0 θεραπευτική εκτομή (αρνητικά όρια εκτομής σε μικροσκοπικό επίπεδο). Παρόλα αυτά, υπολογίζεται, πως περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς



θα αναπτύξουν υποτροπή της νόσου και θα καταλήξουν από αυτή. Αυτό είναι το αποτέλεσμα της πρώιμης μετανάστευσης καρκινικών κυττάρων, σε άλλες απόμακρες της αρχικής εστίας θέσης, ήδη κατά την ώρα της διάγνωσης και της έλλειψης δυνατότητας ανίχνευσής τους με τις τρέχουσες τεχνικές απεικόνισης. Από μια μεγάλη μετα-ανάλυση σχετικά με την εφαρμογή της αξονικής τομογραφίας στην διάγνωση και σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκίνου, έχει υπολογιστεί πως η ευαισθησία, η ειδικότητα και η ακρίβεια της μεθόδου, με βάση το σύστημα κατάταξης TNM (Tissue-Node-Metastasis), είναι για το T: 77%, 3% και 67%, για το N: 76%, 55% και 69%, και για το M: 85%, 98% and 95%, αντίστοιχα.<sup>11</sup> Έχει υπολογιστεί, πως το όριο ανίχνευσης του προτύπου της υπολογιστικής τομογραφίας, είναι περίπου 1 cm<sup>3</sup>, ισοδύναμο με 109 περίπου κύτταρα.

## 1.2 Αιτιοπαθογένεια

Αιτιοπαθογενετικά, ο καρκίνος του παχέος εντέρου σχετίζεται, τόσο με περιβαλλοντικούς, όσο και με γενετικούς παράγοντες.<sup>12,13</sup> Το περιβάλλον διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, πιθανά μέσω των διατροφικών συνηθειών, ειδικά με την κατανάλωση ζωικού λίπους και πρωτεϊνών. Η κατανάλωση τέτοιων τροφών επηρεάζει την εντερική μικροχλωρίδα και εν τέλει τη χημική σύσταση του ενδοαυλικού περιεχομένου.<sup>14</sup> Ειδικότερα, φαίνεται να υπάρχει στενή σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση βοδινού κρέατος, την πέψη μεγάλων ποσοτήτων ζωικού λίπους, και την επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου, αλλά όπως συχνά συμβαίνει με τα επιδημιολογικά δεδομένα, η ακριβής φύση αυτής της συσχέτισης είναι δύσκολο να τεκμηριωθεί με ασφάλεια.<sup>15</sup>

Από μόνοι τους, οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να εκδηλωθούν με ποικίλους τρόπους. Ο πλέον εμφανής είναι η υψηλή προδιάθεση για ορθοκολικό καρκίνο των ασθενών με το σύνδρομο FAP (familial adenomatous polyposis), όπου σχεδόν το 100% των ασθενών θα αναπτύξουν καρκίνο, μέχρι την ηλικία των 50 ετών. Άτομα με άλλες μορφές πολυποδίασης, αλλά και άτομα χωρίς ιστορικό πολυπόδων (όπως στο σύνδρομο κληρονομικού μη-πολυποδιασικού καρκίνου HNPCC, γνωστού και ως Lynch syndrome), εμφανίζουν αυξημένη επίπτωση εμφάνισης της κακοήθειας αυτής.

Μέχρι και σήμερα δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως ζητήματα που αφορούν τη σχέση των μοριακών μεταβολών που παρατηρούνται στους επιθηλιακούς πολύποδες του παχέος εντέρου και τον αντίστοιχο καρκίνο. Ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και ιδιαίτερα αυτοί με ελκώδη κολίτιδα, εμφανίζουν σαφή προδιάθεση για ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου, αλλά αποτελούν ένα πάρα πολύ μικρό ποσοστό των ασθενών στο γενικό πληθυσμό. Μερικά περιστατικά καρκίνου του παχέος έχουν αναπτυχθεί ως απώτερη επιπλοκή ακτινοβολίας στην πύελο, συνήθως για νεοπλασμάτα του τραχήλου της μήτρας.<sup>16,17</sup> Άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει ανάπτυξη νεοπλασμάτων παχέος, ως εμφυτεύσεις, στην ουροδόχο κύστη.<sup>18,19</sup> Επίσης, ενδιαφέρον στοιχείο

αποτελεί η διαπίστωση της συχνής έκκρισης βλέννης, ως πρώιμο σημείο επιθηλιακής μεταπλασίας.<sup>20</sup>

### 1.2.1 Σύνδρομο HNPCC και άλλες μορφές οικογενούς ορθοκολικού καρκίνου

Το σύνδρομο HNPCC οφείλεται σε μεταλλάξεις των κληρονομούμενων γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA (για παράδειγμα στα γονίδια MLH1, MSH2, MSH6, και PMS2), που έχουν ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα μικροδορυφορικής αστάθειας.<sup>21,22</sup> Σε συγγενείς πρώτου βαθμού ατόμων με μεταλλαγμένα αρχέγονα κληρονομούμενα γονίδια (genetic lineage), υπολογίζεται πως υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου πλέον του 50%.<sup>21-23</sup> Τα νεοπλάσματα αυτά, αναπτύσσονται συχνότερα στο εγγύς τμήμα του παχέος εντέρου. Οι ασθενείς με HNPCC παρουσιάζουν επίσης αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθων όγκων και σε άλλες ανατομικές δομές, όπως στο ήπαρ (χολαγγειοκαρκίνωμα), στο ενδομήτριο, στην ουροδόχο κύστη και σε πολλά άλλα όργανα.<sup>24-25</sup>

Από μοριακές μελέτες έχει φανεί, πως στο 10 έως 15% των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου, υπάρχει τουλάχιστον μια πρωτογενής γενετική ανωμαλία, με αποτέλεσμα λανθάνον ταίριασμα νουκλεοτιδικών βάσεων.<sup>26</sup> Η διαταραχή αυτή, έχει ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη αστάθεια σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, που αποκαλείται μικροδορυφορική αστάθεια (MSI).<sup>27-28</sup> Η MSI προκαλείται από την απενεργοποίηση ενός ή μιας ομάδα γονιδίων (όπως τα hMSH2, hMLH1, PMS1, PMS2, hMSH6/GTBP, και hMSH3).<sup>29-30</sup> Τα υψηλά επίπεδα MSI (MSI-High), ως αποτέλεσμα σωματικής απενεργοποίησης από άλλα wild-type αλληλία, αποτελούν τους μοριακούς θεμέλιους λίθους του καρκίνου σε ασθενείς με HNPCC. Σποραδικές μεταλλάξεις σχετιζόμενες με MSI-H ανευρίσκονται συχνότερα σε περιπτώσεις ορθοκολικού καρκίνου, σε σχέση με τα περιστατικά του συνδρόμου HNPCC, με τα τελευταία να αναλογούν μόνο στο 3 έως 5% όλων των ορθοκολικών καρκίνων.<sup>31,32,33</sup> Σποραδικοί όγκοι με MSI-H συνήθως εμφανίζονται λόγω μεταγραφικής αποσιώπησης, μέσω μεθυλίωσης, του υποκινητή του hMLH1 γονιδίου.<sup>34,35</sup> Βάσει της συχνότητας εμφάνισης της MSI-H και της ετήσιας επίπτωσης της νόσου, υπολογίζεται ότι περίπου 20,000 έως 26,000 περιστατικά ορθοκολικού καρκίνου, σχετιζόμενα με αυτή, εμφανίζονται ετησίως στις ΗΠΑ.

Υποομάδα του συνδρόμου HNPCC αποτελούν άτομα οικογενειών με αυξημένη επίπτωση ορθοκολικού καρκίνου, σε έδαφος επίπεδων αδενωμάτων του δεξιού κόλου. Οι αριθμοί των πολυπόδων αυτών είναι ανάμεσα σε αυτούς του συνδρόμου FAP και αυτών του κλασσικού συνδρόμου HNPCC. Στις περιπτώσεις αυτές, τα καρκινώματα εμφανίζονται σε μεγαλύτερες ηλικίες σε σχέση με άλλα δυο σύνδρομα.<sup>36</sup>

### 1.3 Ιστοχημεία, ανοσοϊστοχημεία και άλλα χαρακτηριστικά

Ιστοχημικά, η μεγάλη πλειοψηφία των καρκίνων του παχέος εντέρου είναι θετικοί για χρώσεις βλέννης. Ανοσοϊστοχημικά, στα αδενοκαρκινώματα, οι κύριες πρωτεΐνες της βλέννης, που εκφράζονται με συμβατικές μεθόδους, είναι οι MUC1 και MUC3, σε αντίθεση με την MUC2 που εκφράζεται στον ιδιαίτερο τύπο των βλενωδών αδενοκαρκινωμάτων.<sup>37,38</sup> Επιπλέον, η MUC13 εκφράζεται ειδικά σε φτωχά διαφοροποιημένους όγκους.<sup>39</sup> Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου είναι αρνητικά για την έκφραση της MUC5AC, σε αντίθεση με τους καρκίνους του παγκρέατος και των χοληφόρων.<sup>36</sup>

Τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου είναι σταθερά θετικά στην κυτταροκερατίνη (CK).<sup>40</sup> Συχνότατα υπάρχουν θετικές χρώσεις για την CK20 και αρνητικές για την CK7, ενώ το αντίθετο είναι πολύ σπάνιο. Το εύρημα αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στη διαφορική διάγνωση των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου, από αδενοκαρκινώματα άλλων ανατομικών εντοπίσεων, όπως του πνεύμονα και της ωοθήκης.<sup>41-42</sup> Παρεκκλίνοντα μοτίβα ανοσοαντιδραστικότητας, όπως θετική χρώση CK7, μπορεί να εμφανιστούν σε καρκινώματα φτωχής διαφοροποίησης.<sup>43,44</sup>

Θετική ανοσοαντιδραστικότητα για το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA) αποτελεί τον κανόνα, έτσι ώστε να θεωρείται, πως η αποτυχία έκφρασής του σε ένα αδενοκαρκίνωμα αποδεικνύει ότι η πρωτοπαθής εστία δεν είναι το παχύ έντερο.<sup>45</sup> Η θετικότητα αυτού του δείκτη είναι ισότιμα εκφρασμένη σε όλη την επιφάνεια του κυττάρου, σε αντίθεση με την σημειακή έκφραση στον φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο και στους καλά διαφοροποιημένους όγκους.<sup>45</sup> Υπάρχει καλή συσχέτιση ανάμεσα στην ανοσοϊστοχημική έκφραση για το CEA και στα επίπεδά του στον ορό του αίματος, αλλά όχι ανάμεσα στο στάδιο της νόσου ή τον βαθμό της διαφοροποίησης.<sup>46,47</sup> Μια σειρά από μονοκλωνικά αντισώματα, για διαφορετικούς επίτοπους του μορίου του CEA, είναι σήμερα διαθέσιμα. Από αυτά, όσα αναγνωρίζουν τους επιτόπους 1 και 2 έχουν την μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα.<sup>48</sup>

Κατά την εμβρυογένεση, η CDX2 (caudal-type homeobox gene 2 - γονίδιο που κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων) εμπλέκεται στην ανάπτυξη πολλών οργάνων, μέσω της δημιουργίας ομάδων δομικών πρωτεϊνών. Ανοσοϊστοχημικά, ανευρίσκεται στην πλειονότητα των ορθοκολικών καρκίνων, αλλά μπορεί να εκφραστεί και σε καρκινώματα που παράγουν πρωτοπαθώς βλέννη, όπως της ωοθήκης, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, του παγκρέατος και των χοληφόρων.<sup>60-50</sup>

Η γλυκοπρωτεΐνη που συσχετίζεται με τους όγκους TAG 72 (tumor-associated glycoprotein 72), αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα B72.3, το οποίο δεν είναι μόνο παρόν στο 100%

των διηθητικών ορθοκολικών καρκίνων αλλά και στην πλειοψηφία των υπερπλαστικών και αδενωματούδων πολυπόδων, ακόμα δε και στον φυσιολογικό βλεννογόνο. Η συχνότητα αντίδρασης στην γλυκοπρωτεΐνη αυτή, όπως και το μοτίβο έκφρασής της, μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την κατάσταση.<sup>51</sup>

Άλλοι δείκτες που σταθερά εκφράζονται στους ορθοκολικούς καρκίνους, ανεξάρτητα του βαθμού διαφοροποίησης, είναι η λαχνίνη (κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που σχετίζεται με αξονικά δεμάτια μικροϊνιδίων των επιφανειακών μικρολαχνών), η καθεψίνη Β (λυσοσωματική κυστεϊνική πρωτεϊνάση), η νευροπυλίνη-1 (μόριο που φυσιολογικά βρίσκεται στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα), η SRCA2 (ζωτική ΑΤΡάση για πολλές κυτταρικές λειτουργίες), και η cadherin-17 (γνωστή και ως ήπατο-εντερική cadherin).<sup>64-52</sup> Η καλρετινίνη μπορεί να εκφραστεί από μια μειονότητα των ορθοκολικών αδενοκαρκινωμάτων (ειδικά των μη διαφοροποιημένων), γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στη διαφορική διάγνωση από το μεσοθηλίωμα.<sup>53</sup>

Ένα υψηλό ποσοστό των ορθοκολικών καρκίνων αναδεικνύουν ανοσοϊστοχημική αντιδραστικότητα για την ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και αυτό φαίνεται να είναι συχνό στα βλενώδη και φτωχά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα.<sup>54</sup> Η αλκαλική φωσφατάση του πλακούντα (PLAP) έχει ανευρεθεί σε περίπου 10%.<sup>55</sup> Οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης είναι συνήθως απόντες, έστω παρόντες σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των καρκινικών κυττάρων.<sup>56,57</sup> Η ρασεμάση (δείκτης του προστατικού αδενοκαρκινώματος), εκφράζεται στο 50% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος και αποτελεί συχνά σημαντική αιτία λανθασμένης διάγνωσης.<sup>58</sup>

### 1.3.1 Μοριακά και γενετικά χαρακτηριστικά

Η αναγνώριση διαφόρων τύπων οικογενών καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη μερικών από τις γενετικές μεταβολές που πιθανά σχετίζονται παθογενετικά με την ανάπτυξή τους.<sup>59,60</sup> Σωματικές μεταλλάξεις, όπως στο γονίδιο APC (Adenomatous Polyposis Coli), αλλά και σε άλλα γονίδια επιδιόρθωσης, μπορεί μετέπειτα να εμφανισθούν σε σποραδικούς ορθοκολικούς καρκίνους.<sup>61-62</sup> Το μοντέλο ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, που ακόμη και σήμερα είναι αποδεκτό, είναι αυτό που έχει προταθεί από τους Fearon και Vogelstein στα τέλη της δεκαετίας του 1980<sup>63</sup> (Σχήμα 1), παρότι είναι βέβαιο πως υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στις γενετικές οδούς, που σχετίζονται με την ανάπτυξή του. Ειδικά οι ανεπάρκειες που εμφανίζονται κατά την επιδιόρθωση του DNA, οδηγούν σε μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) η οποία διαδραματίζει εξέχοντα εναλλακτικό δρόμο, που εμφανίζεται σε περίπου 15% των περιπτώσεων του ορθοκολικού καρκίνου.<sup>64-65</sup> Η διαδικασία αυτή λειτουργεί όπως στο σύνδρομο HNPCC και σε σποραδικά καρκινώματα του δεξιού κόλου, που εξορμούνται από ορώδεις

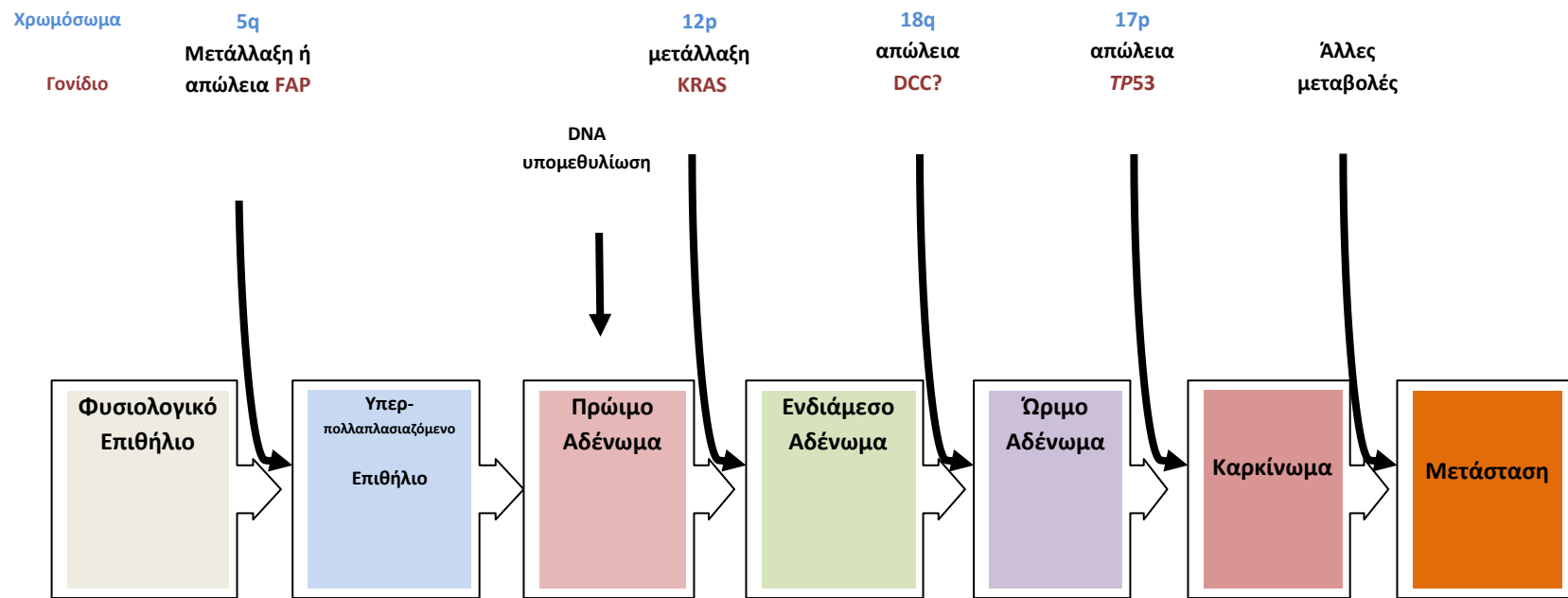
πολύποδες.<sup>66-67</sup> Στο σχήμα 2 αναπαριστώνται διαγραμματικά τα μορφολογικά και μοριακά γεγονότα στην καρκινογένεση του ορθοκολικού καρκίνου.

Οι όγκοι που συσχετίζονται με μικροδορυφορική αστάθεια τείνουν να είναι βλεννώδους τύπου, ή φτωχής διαφοροποίησης, κυκλοτερή ανάπτυξη της βλάβης και κυρίως εντόπιση στο δεξιό κόλον. Σε μια μελέτη, η παρουσία λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο, αναδεικνύεται ως ο πρώτος ιστολογικός προβλεπτικός παράγοντας μικροδορυφορικής αστάθειας.<sup>68,69</sup> Έχει ακόμα παρατηρηθεί, ότι οι διαφορές που μπορεί να υπάρχουν, οφείλονται στα εμπλεκόμενα γονίδια επιδιόρθωσης ειδικού τύπου.<sup>70</sup>

Τα ογκογονίδια που συχνά εμφανίζουν σωματικές μεταλλάξεις στα ορθοκολικά καρκινώματα, είναι τα KRAS, BRAF, PIK3, και CTNNB1.<sup>66</sup> Μεταλλάξεις του ογκογονιδίου KRAS βρίσκονται στο 40% περίπου των ορθοκολικών καρκίνων ενώ του NRAS στο 20%, ειδικά σε αυτούς που έχουν ήδη δώσει μεταστάσεις κατά τη διάγνωση.<sup>71,72</sup> Η παρουσία τέτοιων μεταλλάξεων σχετίζεται με αδυναμία απάντησης σε στοχευμένες θεραπείες έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR).<sup>73</sup>

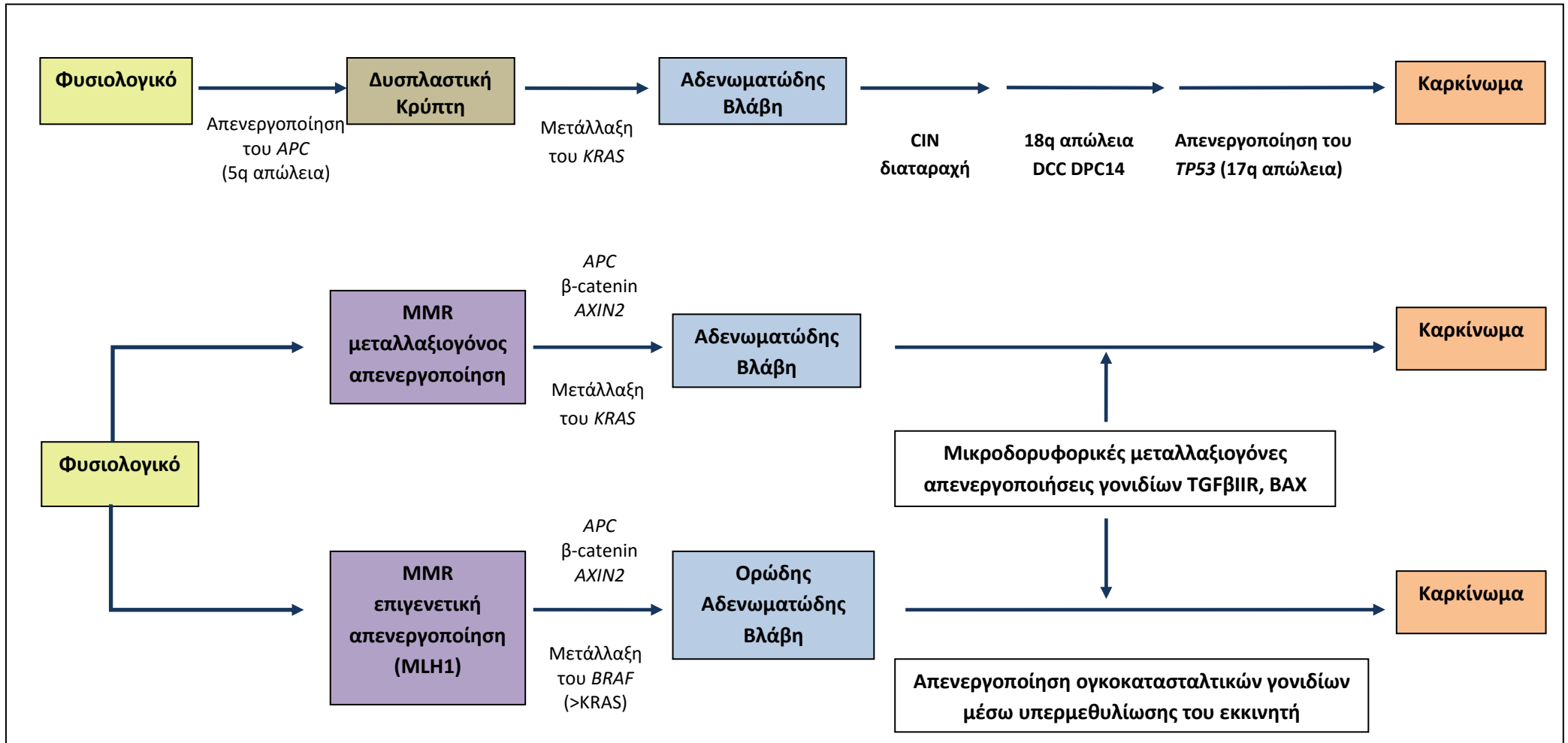
Η β-Catenin, που κωδικοποιείται από το CTNNB1 γονίδιο, συσχετίζεται με την πρωτεΐνη APC και απορρυθμίζεται, είτε ως αποτέλεσμα μετάλλαξης του APC γονιδίου, είτε μετάλλαξης του CTNNB1 και οδηγεί σε παρεκκλίνουσα πυρηνική εντόπιση του μορίου, όπως έχει αναδειχθεί ανοσοϊστοχημικά σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων.<sup>74-75</sup>

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία συχνά εμπλέκονται στον ορθοκολικό καρκίνο, είναι τα TP53, APC, DPC4/SMAD4, DCC και MCC.<sup>66,76</sup> Μεταλλάξεις του TP53 έχουν αναγνωρισθεί με μοριακές τεχνικές στην πλειοψηφία των καρκίνων του παχέος εντέρου, και έχουν συσχετισθεί με υπερέκφραση της πρωτεΐνης, που κωδικοποιείται από το παθολογικό γονίδιο που ανευρήσκεται ανοσοϊστοχημικά.<sup>77</sup> Το 50% περίπου των όγκων αναδεικνύουν αντίστοιχη θετική χρώση, ανεξάρτητα από την περιοχή εμφάνισης, την διαφοροποίηση ή την πλοειδία DNA.<sup>78,79</sup> Όπως αναμένεται, η μεταβατική μορφή του βλεννογόνου, ανάμεσα στα όρια του καρκινώματος και του φυσιολογικού βλεννογόνου είναι ομοιόμορφα αρνητική για τον δείκτη αυτόν.<sup>80</sup>



**Σχήμα 1.**

Διαγραμματική αναπαράσταση των μορφολογικών και μοριακών γεγονότων στην καρκινογένεση του ορθοκολικού καρκίνου.<sup>63</sup>



**Σχήμα 2.**

Γενετικό μοντέλο του ορθοκολικού καρκίνου. **A** Οι περισσότεροι ορθοκολικοί καρκίνοι εξελίσσονται από αδενωματώδεις πολύποδες, κατά τη διάρκεια ετών ή ακόμα και δεκαετιών. Η κληρονομικές και σωματικές γενετικές μεταβολές πιστεύεται ότι αποτελούν τη βάση για την έναρξη και πρόοδο της νόσου. Αν και η σειρά εμφάνισης δεν είναι σταθερή, οι μεταλλάξεις αυτές αναδεικνύουν ισχυρή σχέση με διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. **B** Σε περίπου 20% των ορθοκολικών καρκίνων η διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA (mismatch repair: MMR) απενεργοποιείται, είτε από σωματικές μεταλλάξεις ή από επιγενετικές απενεργοποιήσεις, που οδηγούν σε μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H). Η μεταλλαξιόγonos αυτή απενεργοποίηση είναι η πλέον συνήθης δεύτερη αλλαγή σε ασθενείς που ήδη είναι φορείς γαμετικών μεταλλάξεων των MMR γονιδίων και πάσχουν από σύνδρομο HNPCC. Επιγενετική απενεργοποίηση των MMR γονιδίων πιο συχνά επηρεάζει την υπερμεθυλίωση του εκκινητή MLH1. Αυτοί οι όγκοι αρχικά παρουσιάζονται ως ορώδεις/αδενωματώδεις βλάβες, εμφανίζουν υπερμεθυλίωση πολλών γονιδίων (όπως νησιδιακός μεθυλιωμένος φαινότυπος: CpG, island methylation phenotype: CIMP) και παρουσιάζουν μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF. Στους οικογενείς, αλλά και στους σποραδικούς όγκους MSI-H, η απενεργοποίηση των γονιδίων με επαναλαμβανόμενα στοιχεία (μικροδορυφορικές αλλαγές) μπορεί να συμβάλλει στην πρόοδο του όγκου (όπως, TGFBIIR, BAX).<sup>66</sup>

## 1.4 Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα των νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου είναι ανάλογη της πρωτοπαθούς θέσης του όγκου. Λόγω της διαφορετικής σύστασης των μυϊκών χιτώνων, στις διάφορες μοίρες του παχέος εντέρου, υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία των κλινικών ευρημάτων, που εκδηλώνονται με βραδεία ή οξεία εμφάνιση και που μπορεί να εγείρουν την υποψία ύπαρξης νεοπλασματος.

Στο δεξιό κόλον (τυφλό, ανιόν), ο καρκίνος του παχέος εντέρου έχει «ύπουλη» εμφάνιση, τόσο κλινικά, όσο και ιστολογικά (συχνότερα ανθοκραμβοειδής) και διαφέρει από αυτόν του αριστερού κόλου.<sup>81</sup> Λόγω της εγγύτερης θέσης του δεξιού κόλου, προς το μεσόκολο, η εντόπιση του καρκίνου σε αυτό, δίνει γρηγορότερα μεταστάσεις. Κύρια κλινικά ευρήματα είναι η αίσθηση αδυναμίας, λόγω της υπόχρωμης αναιμίας, που προκύπτει από τις συχνές υποκλινικές μικροαιμορραγίες. Η δυσπεψία και η επίμονη δυσφορία αποτελούν άλλα συχνά συμπτώματα, με ή χωρίς συνοδό κοιλιακό άλγος και λανθασμένα μπορεί να αποδοθούν σε χολοκυστοπάθεια ή πεπτικό έλκος.

Πολλές φορές, εάν δεν έχει γίνει έγκυρη διάγνωση του νεοπλασματος, είναι δυνατόν να υπάρξει ψηλαφητή μάζα χωρίς να έχει προκαλέσει ακόμη απόφραξη. Αυτή η ασυνήθιστη κατάσταση οφείλεται στην υπερδιπλάσια διάμετρο από του δεξιού, σε σχέση με το αριστερό κόλον. Όταν όμως αυτό εντοπίζεται στην περιοχή της ειλεοτυφλικής βαλβίδας ή της ηπατοκολικής καμπής, τα συμπτώματα απόφραξης μπορεί να εμφανισθούν σχετικά νωρίς. Αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό ανεύρεσης νεοπλασματος, σε περιπτώσεις λαπαροτομίας, λόγω εσφαλμένης διάγνωσης οξείας σκωληκοειδίτιδας (έως και 10%). Ο καρκίνος της περιοχής αυτής παρουσιάζεται με τη μορφή φλεγμονώδους μάζας, δίνοντας εικόνα σκωληκοειδικού πλακούντα (plastron). Έτσι, σε ηλικίες στις οποίες η εμφάνιση οξείας σκωληκοειδίτιδος είναι λιγότερο συχνή, όχι σπάνια η κατάσταση αντιμετωπίζεται ως επί υπάρξεως φλεγμονώδους εξεργασίας, με χημειοπροφύλαξη και μετά την πάροδο μικρού χρονικού διαστήματος, και την υποχώρηση της συμπτωματολογίας, επιβάλλεται η απεικονιστική και ενδοσκοπική διερεύνηση.

Στο αριστερό κόλον, ο καρκίνος εμφανίζει εντελώς διαφορετική συμπτωματολογία. Αρχικά, αρκετοί ασθενείς, εμφανίζουν αλλαγή των συνηθειών του εντέρου, με εναλλαγές δυσκοιλιότητας και ψευδοδιάρροιας. Εδώ, η διάμετρος του παχέος εντέρου είναι μικρότερη, το περιεχόμενο συμπαγέστερο και ο καρκίνος συχνότερα σκίρος (κυριαρχεί ο συνδετικός ιστός), οπότε οδηγούμαστε συχνότερα σε απόφραξη. Η εμφάνιση δυσκοιλιότητας, εναλλάξ με διάρροια (μικρές συχνές κενώσεις), είναι αποτέλεσμα της κυκλοτερούς πίεσης του αυλού. Η αιμορραγία αποτελεί ένα ακόμη συχνό κλινικό εύρημα. Συνήθως το αίμα είναι αναμειγμένο με τα κόπρανα, όταν το



νεόπλασμα εντοπίζεται στο κατιόν ή στο σιγμοειδές, ενώ αιμορραγία που συνοδεύει την αφόδευση εμφανίζεται όταν αυτό εντοπίζεται χαμηλότερα.

Ο καρκίνος του αριστερού παχέος εντέρου εμφανίζεται συνηθέστερα με απόφραξη. Προ της ελεύσεως της απόφραξης, οι ασθενείς μπορεί να παραπονεθούν για διαλείπον κωλικοειδές άλγος, λόγω του αυξημένου περισταλτισμού, στην προσπάθεια προώθησης του περιεχομένου πέραν της απόφραξης. Εάν υπάρχει ψηλαφητός φλεγμονώδης όγκος, αυτός μπορεί να αποδοθεί λανθασμένα σε εκκολπωματίτιδα.

## **1.5 Διάγνωση και αντιμετώπιση**

### **1.5.1 Ιστολογική διάγνωση και σταδιοποίηση**

Ακρογωνιαίος λίθος της ιστολογικής διάγνωσης του καρκίνου του παχέος εντέρου, είναι η ενδοσκοπική βιοψία, η οποία θα πρέπει πάντα να γίνεται στα πλαίσια ολικής κολοσκόπησης, είτε στα πλαίσια ασυμπτωματικού ελέγχου, είτε στη διερεύνηση πιθανής αιτίας σημείων και συμπτωμάτων από το κατώτερο πεπτικό. Η προεγχειρητική σταδιοποίηση, τουλάχιστον σε περιστατικά που αντιμετωπίζονται εκλεκτικά, θα πρέπει πάντα να προηγείται πιθανής χειρουργικής παρέμβασης, ώστε να σχεδιάζεται το θεραπευτικό πρωτόκολλο, με τον πλέον ενδεδειγμένο τρόπο. Η σταδιοποίηση επιτυγχάνεται με το συνδυασμό διαφόρων μεθόδων. Η ανάπτυξη των ακτινολογικών απεικονιστικών μεθόδων (υπέρηχοι, αξονική και μαγνητική τομογραφία) και η παράλληλη πρόοδος, των καθοδηγούμενων τεχνικών διαδερμικής βιοψίας, επιτρέπουν την προεγχειρητική διάγνωση στην πλειονότητα των περιπτώσεων.

Επιπρόσθετα, σε κάποιες περιπτώσεις, χρήσιμη διαδικασία μπορεί να είναι και η διαγνωστική λαπαροσκόπηση, η οποία είναι σε θέση να αναδείξει μικρές περιτοναϊκές ή ηπατικές μεταστάσεις. Με τις παραπάνω τεχνικές μεθόδους η αποφυγή άσκοπων λαπαροτομιών (open and close), για μη εξαιρέσιμους καρκίνους, μπορεί να μειωθεί σε λιγότερο από 5%.

Οι παραπάνω σημαντικές εξελίξεις έχουν επιφέρει μείωση των άσκοπων και επιπόνων διαδικασιών, για την ακριβή προεγχειρητική σταδιοποίηση. Οι τεχνικές αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές, εκεί όπου η χειρουργική επέμβαση μπορεί να συνοδεύεται με αυξημένη θνησιμότητα, λόγω συμπαρομαρτούντων καταστάσεων.

### **1.5.2 Χειρουργική αντιμετώπιση**

Η χειρουργική θεραπεία αποτελεί τη βασική μέθοδο αντιμετώπισης των νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου και την κύρια ελπίδα ίασης, για τους περισσότερους ασθενείς. Η χειρουργική προσπέλαση είναι περισσότερο αποτελεσματική, όταν το νεόπλασμα είναι τοπικά περιορισμένο, με

ικανοποιητικά ποσοστά μακράς επιβίωσης. Σε μερικούς τύπους καρκίνου ακόμη και όταν αυτοί διαγιγνώσκονται στο μεταστατικό στάδιο, η επιβίωση είναι σχετικά ικανοποιητική.

Οι τρεις κύριοι στόχοι της χειρουργική αντιμετώπισης των ογκολογικών ασθενών, είναι η επίτευξη διάγνωσης και σταδιοποίησης, η δυνητικά θεραπευτική R0 εκτομή και τέλος η παρηγορική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και η βελτίωση της ποιότητας ζωής.

### **1.5.3 Χειρουργικές τεχνικές**

Γενικά στη χειρουργική ογκολογία, η en-bloc εκτομή είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί στους καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου και σε νεοπλασμάτα με λεμφαγγειακή διασπορά.<sup>82</sup> Επεκτάθηκε ταχύτατα και στην αντιμετώπιση νεοπλασμάτων του πεπτικού συστήματος, όπως στομάχου και οισοφάγου. Σήμερα θεωρείται, πως τέτοιου είδους εκτομές είναι συνήθως περισσότερο επιτυχείς στην αντιμετώπιση νεοπλασμάτων που εμφανίζουν αιματογενή διασπορά, σε σύγκριση με αυτά με λεμφαγγειακή.

Παρότι μέχρι σήμερα, δεν έχει διαπιστωθεί σαφές πλεονέκτημα της επιθετικής en-bloc εκτομής για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο αντικειμενικός στόχος της χειρουργικής θεραπείας συνεχίζει να είναι η επαρκής εκτομή του όγκου (με όρια εκτομής αρνητικά: R0 εκτομή), η αφαίρεση της αλύσου των τοπικοπεριοχικών λεμφαδένων (μέσω των οποίων παροχετεύεται η λέμφος από την περιοχή της βλάβης), καθώς επίσης και η αποκατάσταση της εντερικής συνέχειας (με την κατασκευή αναστόμωσης με επαρκή αιμάτωση και χωρίς τάση).<sup>82</sup> Ασφαλές περιφερικό όριο εκτομής θεωρείται μήκος εντέρου 5 cm, όμως θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, ότι το μήκος αυτό αντιστοιχεί μόνο σε 2 cm, αν έχει εφαρμοσθεί έλξη του.<sup>83</sup> Με την εξαίρεση των εκτομών περιορισμένης έκτασης που διενεργούνται σε επιλεγμένους ασθενείς και οι οποίες στερούνται ογκολογικής επάρκειας, οι βασικές επεμβάσεις αντιμετώπισης του καρκίνου του παχέος εντέρου περιλαμβάνουν: τη δεξιά ημικολεκτομή, την εκτεταμένη δεξιά ημικολεκτομή, την εγκαρσιεκτομή, την αριστερή ημικολεκτομή, τη σιγμοειδεκτομή, την υφολική κολεκτομή, την χαμηλή και υψηλή πρόσθια εκτομή του ορθού, καθώς και την υφολική και ολική κολεκτομή.<sup>82</sup>

### **1.5.4 Συμπληρωματική (επικουρική) θεραπεία**

Μετά την ριζική χειρουργική εξαίρεση της νόσου, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών θα υποτροπιάσει, συνήθως με την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων (το 25% των ασθενών με νόσο σταδίου II και το 50% έως 60% με νόσο σταδίου III, εντός της 5ετίας). Αυτό είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης μικρομεταστατικής νόσου κατά την φάση της αρχικής αντιμετώπισης, η οποία δεν είναι δυνατόν να διαπιστωθεί. Στόχος, λοιπόν, της συμπληρωματικής θεραπείας είναι η εκρίζωση αυτής της υπολειμματικής μικροσκοπικής νόσου. Ο κίνδυνος της υποτροπής σχετίζεται

με διάφορους παράγοντες, όπως τα κλινικά, ιστολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου. Κακοί προγνωστικοί παράγοντες θεωρούνται το προχωρημένο κατά TNM στάδιο, τα αυξημένα προεγχειρητικά επίπεδα του CEA, ο ανεπαρκής αριθμός εξαιρεθέντων λεμφαδένων (<10) και η εμφάνιση νόσου με αιμορραγία, εντερική απόφραξη ή διάτρηση.<sup>84</sup> Η διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα.<sup>84</sup> Επίσης, άλλοι σημαντικοί παράγοντες, των οποίων η προγνωστική αξία είναι υπό αξιολόγηση, είναι ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, η διήθηση αγγείων και λεμφαγγείων, οι περινευρικές διηθήσεις, η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), κ.ά.,<sup>84</sup>

### 1.5.5 Συμπληρωματική (επικουρική) θεραπεία σταδίου II και III

Συμπληρωματική θεραπεία σημαίνει χορήγηση ειδικής φαρμακευτικής αγωγής με στόχο την μείωση του κινδύνου υποτροπής της νόσου. Η απόφαση χορήγησής της θα πρέπει να λαμβάνεται μέσω ογκολογικών συμβουλίων και τα ερωτήματα που θα πρέπει να συνεκτιμηθούν, αφορούν την πιθανότητα παρουσίας μικρομεταστατώσεων, την αποτελεσματικότητα της επικουρικής αυτής θεραπείας, καθώς και τις παρενέργειές της.

Ο κίνδυνος ύπαρξης μικρομεταστάσεων εκτιμάται μετεγχειρητικά, μέσω της εκτίμησης των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών της πρωτοπαθούς εστίας. Σε στάδια A και B κατά Astler-Coller (στάδιο II κατά TNM), όπου η μυϊκή στοιβάδα δεν έχει διασπαστεί, η πιθανότητα υποτροπής είναι μόνο 10% στην 5-ετία και η χορήγηση επικουρικής θεραπείας δεν ενδείκνυται.<sup>85</sup>

Αντίθετα σε στάδιο C (στάδιο III κατά TNM), όπου υπάρχει επέκταση της νόσου στους περιοχικούς λεμφαδένες, η πιθανότητα υποτροπής ανέρχεται στο 50% περίπου και επαρκή βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν τη χορήγησή της.<sup>85</sup> Μεγάλες, τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει, ότι σε ασθενείς σταδίου III, η χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας με 5-FU (5-fluorouracil) σε συνδυασμό με leucovorin calcium (LV) για 6 μήνες, ελαττώνει τον σχετικό κίνδυνο θανάτου κατά 30%, σε σχέση με την χειρουργική αντιμετώπιση μόνο. Το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί σε απόλυτο όφελος επιβίωσης μεγαλύτερο του 10%.<sup>86</sup>

Ο ρόλος της χημειοθεραπείας σε ασθενείς με νόσο σταδίου II δεν έχει επαρκώς τεκμηριωθεί, φαίνεται όμως, πως λόγω της μη ύπαρξης διηθημένων λεμφαδένων, το σχετικό όφελος στην πενταετή επιβίωση περιορίζεται στο 2-5%.<sup>87,88</sup> Στο στάδιο αυτό, δυσμενείς παράγοντες είναι ο ανεπαρκής αριθμός εξαιρεθέντων λεμφαδένων (<10), όγκοι T4, η εμφάνιση της νόσου με αιμορραγία, η εντερική απόφραξη ή διάτρηση, η παρουσία λεμφαγγειακών και περινευρικών διηθήσεων και ο χαμηλός βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης. Σε ασθενείς με τέτοιους παράγοντες υψηλού κινδύνου και χωρίς παρουσία συννοσηρότητας, η χορήγηση προφυλακτικής επικουρικής θεραπείας, αποτελεί σύγχρονη πρακτική.

## 1.6 Ιστολογική εκτίμηση όγκου

### 1.6.1 Γενικά στοιχεία

Το χειρουργικό παρασκεύασμα θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά κατά την παραλαβή του από το χειρουργείο και κατόπιν να καθηλώνεται και να σταθεροποιείται σε διάλυμα φορμόλης 10%. Η επισκόπηση του κλειστού παρασκευάσματος παρέχει σημαντικές πληροφορίες. Η διάταση του αυλού είναι ενδεικτική απόφραξης και αναδεικνύει το εγγύς όριο, η αναδίπλωση του ορογόνου δείχνει λιπώδη διήθηση και η ψηλάφηση αποκαλύπτει την περιμετρική έκταση του όγκου. Τα ιστολογικά δείγματα πρέπει να λαμβάνονται σύντομα, γιατί η παραμονή του παρασκευάσματος στο διάλυμα φορμόλης για περισσότερο από δύο ημέρες τείνει να δημιουργεί στρεβλώσεις σχετικά με την ακριβή ανατομική θέση τα διάφορα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και τον ακριβή υπολογισμό των ορίων εκτομής.<sup>111</sup>

Το μεσεντέριο και περικοιλικό λίπος θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά, για την ύπαρξη διηθημένων λεμφαδένων, καθώς και για στοιχεία αγγειακής προσβολής. Οι διηθημένοι λεμφαδένες εμφανίζονται διευρυμένοι, σκληροί και λευκωποί. Το χειρουργικό παρασκεύασμα πρέπει να διανοίγεται κατά μήκος του αντιμεσεντερικού χείλους, εκτός εάν είναι εμφανές, πως ο όγκος αφορά σε αυτή ακριβώς την περιοχή. Στην περίπτωση αυτή, το παρασκεύασμα το εντέρου θα πρέπει να διανοίγεται προσεκτικά και αποφεύγοντας τη διατομή του όγκου.

### 1.6.2 Εκτίμηση ορίων εκτομής

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η επίτευξη αρνητικών χειρουργικών ορίων δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα. Η μεγάλη συζήτηση κατά το παρελθόν αφορούσε κυρίως σε νεοπλάσματα του ορθού και ιδιαίτερα το άπω χειρουργικό όριο, λόγω της προσπάθειας συγκερασμού του σωστού ογκολογικού αποτελέσματος, με την όσο το δυνατόν συχνότερη διατήρηση του σφιγκτηριακού μηχανισμού και την αποφυγή μόνιμης στομίας. Τα περισσότερα νεοπλάσματα του παχέος εντέρου, εκτός των βλενωδών, σπάνια εκτείνονται σε απόσταση μεγαλύτερη των 1,5 cm. Κάθε όγκος που μακροσκοπικά απέχει περισσότερο των 5 cm από το χειρουργικό όριο και δεν παρουσιάζει χαμηλή διαφοροποίηση ή/και βλενώδη ή δίκην «σφραγιστήρος δακτυλίου» ιστολογία, πιθανότατα δεν έχει διηθημένα εγχειρητικά όρια.<sup>111, 89</sup>

### 1.6.3 Εξέταση των λεμφαδένων

Το στάδιο της νόσου αποτελεί τον σημαντικότερο προγνωστικό δείκτη, ώστε ο προσδιορισμός της ύπαρξης ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων έχει κομβική σημασία. Οι εγγύς του όγκου λεμφαδένες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα διήθησης. Το παρασκεύασμα πρέπει να διατέμνεται προσεκτικά και να ελέγχεται διεξοδικά από το μυϊκό χιτώνα μέχρι το περικοιλικό λίπος.

Χρησιμοποιώντας τεχνικές εκκαθάρισης λίπους, η παρουσία μεταστάσεων μπορεί να ταυτοποιηθεί στο 45% έως 78% των λεμφαδένων με διάμετρο μικρότερη των 5 mm.<sup>90-91</sup> Η ανίχνευση διήθησης τέτοιων μικρών λεμφαδένων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ακριβή σταδιοποίηση.<sup>91</sup> Αρκετές ομάδες ερευνητών, χρησιμοποιώντας τεχνικές εκκαθάρισης λίπους, προσδιόρισαν ένα σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό διηθημένων λεμφαδένων, σε σύγκριση με δείγματα που εξετάστηκαν με συμβατικές μεθόδους. Η συμβατική ιστολογική εξέταση ανέδειξε λεμφαδενικές μεταστάσεις στο 43,7% των ασθενών, αλλά μετά από εκκαθάριση λίπους ένα περαιτέρω ποσοστό 4,8% των λεμφαδένων βρέθηκαν θετικοί.<sup>91</sup> Δυστυχώς όμως, οι τεχνικές αυτές έχουν αυξήσει το χρόνο ολοκλήρωσης της ιστολογικής εξέτασης του παρασκευάσματος, ενώ επιπλέον σε άλλες μελέτες δεν επιβεβαιώθηκε η χρησιμότητά τους.<sup>116-92</sup>

#### **1.6.4 Αναγνώριση φλεβικής διήθησης**

Η ύπαρξη φλεβικής διήθησης πρέπει να απαραίτητα να προσδιορίζεται στην ιστολογική έκθεση, ανάλογα με τον τρόπο εμφάνισής της (μικροσκοπική: V1, γενικευμένη: V2) και επίσης να προσδιορίζεται με σαφήνεια αν αυτή είναι περιορίζεται ενδοτοιχωματικά ή επεκτείνεται εξωτοιχωματικά.<sup>89</sup>

#### **1.6.5 Τομές που πρέπει να ληφθούν**

Από κάθε νεόπλασμα θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον τρεις ολοτοιχωματικές ιστολογικές τομές, ώστε να εκτιμάται με ασφάλεια το βάθος διήθησης.<sup>89</sup> Μια ή δυο τομές πρέπει να λαμβάνονται μέχρι και το περικολικό λίπος, ώστε να αναγνωριστούν πιθανές εξωτοιχωματικές φλεβικές διηθήσεις. Άλλες τομές θα πρέπει να περιλαμβάνουν το εγγύς και άπω όριο εκτομής. Περαιτέρω, θα πρέπει να αναφέρονται άλλες πιθανές βλεννογονικές βλάβες και να εξετάζονται ένα ή δύο τμήματα φυσιολογικού ιστού και μια τομή της σκωληκοειδούς απόφυσης, εάν αυτή περιλαμβάνεται στην εκτομή. Οι λεμφαδένες θα πρέπει να εντοπίζονται προσεκτικά και να αναφέρονται ανάλογα με την τοποθεσία τους (παρά τον όγκο, εγγύς ή περιφερικά).<sup>89</sup>

#### **1.6.6 Ιστολογική έκθεση**

Η σύνταξη της ιστολογικής έκθεσης συστήνεται να ακολουθεί τις οδηγίες της ADASP (Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology).<sup>93</sup> Οι σχετικές συστάσεις αφορούν σε τέσσερις κύριους τομείς: α) στοιχεία μακροσκοπικής περιγραφής, β) πρόσθετες διαγνωστικές πληροφορίες, γ) προαιρετικά χαρακτηριστικά και δ) κατάλογο ελέγχου των υπό εξέταση τμημάτων, όπως αυτές περιγράφονται παρακάτω:<sup>93</sup>

##### α) Μακροσκοπική περιγραφή

- Τρόπος λήψης του παρασκευάσματος (φρέσκο, σε φορμόλη, διανοιχθέν, κλπ.)

- Ταυτοποίηση παρασκευάσματος με ετικέτα (όνομα, αριθμός) και ορισμός του ως τμήμα παχέος εντέρου
- Ανατομική μοίρα του παρασκευάσματος, μήκος, άλλες συναφαιρεθείσες δομές
- Περιγραφή του όγκου: ανατομική θέση, εγγύτητα πλησιέστερου ορίου, κύριοι υπότυποι (πολυποειδής, δακτυλιοειδής, ελκώδης, διηθητικός, κατά συνέχεια ιστού, πλαστική λινίτιδα), διαστάσεις, μακροσκοπικό βάθος διήθησης, κατάσταση ορογόνου παρά τον όγκο
- Παρουσία χαρακτηριστικών απόφραξης (εγγύς διάταση)
- Παρουσία διάτρησης
- Κατάσταση υπολειμματικών πολυπόδων, ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος, εκκολπώματα, έλκη, στενώσεις
- Παρουσία θετικών λεμφαδένων και εντόπισή τους.
- Καθορισμός ιστού που χρησιμοποιήθηκε για έρευνα (π.χ. κυτταρομετρία ροής)

## β) Πρόσθετες διαγνωστικές πληροφορίες

- Εντόπιση όγκου
- Ιστολογικός υπότυπος: α) αδενοκαρκίνωμα (μη προσδιοριζόμενο διαφορετικά), β) βλεννώδες (ύπαρξη βλέννης > 50%), γ) δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (> 50% των κυττάρων), δ) αδενοπλάκωδες, ε) από μικρά αδιαφοροποίητα κύτταρα (oat cell – κύτταρα δίκην βρώμης), στ) αδιαφοροποίητο, ζ) άλλου τύπου
- Βαθμός διαφοροποίησης: α) καλά διαφοροποιημένα (σύνθετα ή απλά σωληνάκια, εύκολα διακρινόμενη πυρηνική πολικότητα, ομοιομορφία μεγέθους πυρήνων), β) μέτρια διαφοροποιημένα (σύνθετα, απλά ή ελαφρά ακανόνιστα σωληνάκια, ή με ελαφρώς διακρινόμενη ή απύουσα πυρηνική πόλωση) και γ) φτωχής διαφοροποίησης (υψηλά ακανόνιστα αδένια, απουσία αδενικής διαφοροποίησης με απώλεια της πυρηνικής πολικότητας)
- Βάθος διήθησης βασισμένο στο σύστημα ταξινόμησης TNM<sup>93,94</sup>

Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να προσδιορισθεί
T0	Δεν υπάρχει παρουσία πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Καρκίνωμα in situ: ενδοεπιθηλιακό ή διήθηση της βλεννογόνιας στοιβάδας. Συμπεριλαμβάνει τα καρκινικά κύτταρα που υπάρχουν εντός της αδενικής βασικής μεμβράνης (ενδοεπιθηλιακά) ή της βλεννογόνιας βασικής στοιβάδας (ενδοβασικά), χωρίς να εκτείνεται στην μυϊκή χιτώνα ή στον υποβλεννογόνο
T1	Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνο χιτώνα, χωρίς όμως διήθηση του μυϊκού χιτώνα
T2	Ο όγκος διηθεί τον μυϊκό χιτώνα
T3	Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνο και μυϊκό χιτώνα και εισέρχεται στο περιτολικό ή περιορθικό λίπος
T4a	Ο όγκος διηθεί την επιφάνεια του ορογόνου ή του σπλαχνικού περιτοναίου. Άμεση διήθηση στους όγκους T4, περιλαμβάνει τη διήθηση σε άλλα όργανα, ή άλλα σημεία του παχέος, όπως έχει επιβεβαιωθεί στην μακροσκοπική εξέταση (για παράδειγμα διήθηση του σιγμοειδούς από καρκίνωμα του τυφλού), ή για όγκους στην οπισθοπεριτοναϊκή ή υποπεριτοναϊκή περιοχή, άμεση διήθηση σε άλλα όργανα η δομές διαμέσου της βλεννογόνιας μυϊκής στοιβάδας (όπως όγκος στο οπίσθιο τοίχωμα του κατιόντος κόλου που διηθεί τον αριστερό νεφρό ή τα πλάγια κοιλιακά τοιχώματα, ή ένας κεντρικός η πλάγιος όγκος του ορθού που διηθεί τον προστάτη, τις σπερματοδόχους κύστες, την μήτρα ή τον κόλπο). <sup>94</sup>
T4b	Ο όγκος διηθεί άμεσα, ή είναι σε επαφή με γειτονικά όργανα ή δομές. Εάν όμως δεν υπάρχει μικροσκοπική διήθηση, η κατηγοριοποίηση πρέπει να αναφέρεται ως pT1-4a, ανάλογα του βάθους διήθησης. Οι κατηγοριοποιήσεις V και L πρέπει να χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση της παρουσίας ή απουσίας αγγειακής ή λεμφαγγειακής διήθησης, ενώ ο παράγοντας PN, ειδικά για την τοπική περινευρική διήθηση. <sup>94</sup>
- Λεμφαδενικές μεταστάσεις

Nx	Αδυναμία εκτίμησης τοπικών λεμφαδένων
N0	Δεν υπάρχει μετάσταση στους τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε 1 – 3 τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες
N1a	Μετάσταση σε 1 τοπικοπεριοχικό λεμφαδένα
N1b	Μετάσταση σε 2 – 3 τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες
N1c	Εναποθέσεις του όγκου στον υποορογόνο, στο μεσεντέριο, ή στους μη περιτοναϊκούς, περιτολικούς ή περιορθικούς ιστούς, χωρίς τοπικοπεριοχική λεμφαδενική μετάσταση
N2	Μετάσταση σε 4 ή περισσότερους τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες
N2a	Μετάσταση σε 4 – 6 τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες
N2b	Μετάσταση σε 7 ή περισσότερους τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες
- Παρουσία εναποθέσεων στο μεσεντέριο
- Άλλες τοποθεσίες βιοψιών (περιτόναιο, γειτονικά όργανα, ήπαρ, ωοθήκες)

- Επάρκεια τοπικής εκτομής (ακτινικό, εγγύς, άπω όριο). Στο ορθό το βαθύτερο όριο (περιφερικό και πλάγιο όριο) θα πρέπει να αξιολογείται. Ως περιφερικό όριο ορίζεται το σημείο στο οποίο ο όγκος φθάνει πλησιέστερα στο χειρουργικό όριο (πλευρικά και περιφερειακά) και είναι συνήθως το βαθύτερο σημείο διήθησης του ορθού. Για το παχύ έντερο εκτός του ορθού, το πλευρικό χειρουργικό όριο αντιστοιχεί στο μεσεντερικό σημείο της εκτομής και είναι συνήθως ελεύθερο από τον όγκο, εκτός εάν η εκτομή έχει σκόπιμα διεξαχθεί κοντά στο τοίχωμα του εντέρου.
- Άλλα συνυπάρχοντα νοσήματα (ΙΦΝΕ, άλλοι όγκοι, πολύποδες, σύνδρομο FAP, εκκολπωματική νόσος και οι επιπλοκές της)
- Αν οι πληροφορίες που απαιτούνται για την πρόγνωση ή θεραπεία δεν είναι διαθέσιμες (π.χ., δεν βρέθηκαν λεμφαδένες ή δεν μπορεί να προσδιοριστεί το πλευρικό όριο εκτομής), αυτό πρέπει να αναφέρεται ρητά στην έκθεση.
- Στάδιο και TNM σύστημα<sup>93,94</sup>

Στάδιο	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
IIIC	T1-T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	κάθε T	κάθε N	M1a
IVB	κάθε T	κάθε N	M1b
IVC	κάθε T	κάθε N	M1b

## 1.7 Αγγειογένεση

Η διαδικασία κατά την οποία νέα αιμοφόρα αγγεία δημιουργούνται από προϋπάρχοντα αγγεία, ονομάζεται αγγειογένεση, και έχει ιδιαίτερη σημασία στην εξέλιξη πολλών νοσημάτων (καρκίνος, ισχαιμική καρδιοπάθεια, φλεγμονή), αλλά και σε φυσιολογικές διαδικασίες (επούλωση τραύματος).<sup>95</sup> Η αγγειογένεση πρέπει να διαχωριστεί από διάφορες άλλες συναφείς διαδικασίες, όπως η αρτηριογένεση, η λεμφαγγειογένεση και η δημιουργία του κυκλοφορικού συστήματος στο έμβρυο. Η τελευταία, αρχικά αναφερόταν στην *de novo* σύνθεση νέων αγγείων από πρωτόγονα κύτταρα, η οποία επισυμβαίνει στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Πρόσφατα όμως, η διαφορά αυτή έγινε λιγότερο διακριτή, λόγω της τεκμηρίωσης του ρόλου των προγονικών

ενδοθηλιακών κυττάρων του μυελού των οστών και της αιματικής κυκλοφορίας και της συμβολής τους στην αγγειογένεση στους ενήλικες.<sup>96</sup> Ο συχνά χρησιμοποιούμενος όρος αγγειογένεση, ο οποίος περιγράφει τη δημιουργία αγγείων μικρού εύρους, πρέπει να διαχωρισθεί από την αρτηριογένεση, παρότι και οι δύο διαδικασίες επάγονται από κοινό παράγοντα, τον αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου (VEGF-A: Vascular Endothelial Growth Factor-A).<sup>97</sup> Τέλος, διαφορετική διαδικασία αποτελεί επίσης η λεμφαγγειογένεση, η δημιουργία δηλαδή νέων λεμφαγγείων, αν και ο VEGF-A (όπως βέβαια και άλλοι αυξητικοί παράγοντες), μπορεί να επάγει άμεσα ή έμμεσα και αυτή.<sup>98</sup>

### **1.7.1 Φυσιολογική αγγειοποίηση και παθολογική αγγειογένεση**

Η δημιουργία νέων αγγείων μπορεί να ειπωθεί ως φυσιολογική, ή και παθολογική διαδικασία. Ο διαχωρισμός αυτός μπορεί να βασισθεί στον διαφορετικό τύπο αγγείων, που η κάθε μια επάγει. Η φυσιολογική αγγειογένεση (αγγειοποίηση) ξεκινά στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και συνεχίζεται μετά τη γέννηση, με στόχο τη δημιουργία των φυσιολογικών αιμοφόρων αγγείων. Τα φυσιολογικά αγγεία είναι χωροθετημένα σε φυσιολογικούς και στενά οριοθετημένους χώρους και είναι οργανωμένα σε μια ιεραρχία από ελαστικές και μυώδεις αρτηρίες, αρτηρίδια, τριχοειδή, μετατριχοειδικές αντλίες, και σε μικρές και μεγάλες φλέβες. Σε αντίθεση με την καλή οργάνωση και λειτουργικότητά τους, τα νέα αγγεία, των οποίων η δημιουργία επάγεται στην παθολογική αγγειογένεση (λόγω όγκων, μυοκαρδιακών εμφράκτων, χρόνιας φλεγμονής, αλλά και στην επούλωση τραυμάτων), εμφανίζουν μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά (όχι ενιαία κατανομή, ανώμαλη διακλάδωση, συχνές αρτηριοφλεβικές επικοινωνίες και μη ικανοποιητική ιεραρχική μορφοποίηση).<sup>95,99</sup> Επίσης, εμφανίζουν δομική και λειτουργική ετερογένεια ποικίλης κατεύθυνσης και συχνά υπερδιαπερατότητα στις πρωτεΐνες του πλάσματος.

### **1.7.2 Αγγειογενετικοί παράγοντες**

Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF ή VEGF-A), που αναφέρεται και ως παράγοντας διαπερατότητας των αγγείων (Vascular Permeability Factor), είναι ευρέως γνωστός, για τον σημαντικό του ρόλο στη ρύθμιση, τόσο της φυσιολογικής, όσο και της παθολογικής ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων.<sup>100</sup> Αποτελεί μέλος ευρύτερης οικογένειας αυξητικών παραγόντων, η οποία περιλαμβάνει και άλλους τέσσερις παράγοντες, τους VEGF-B, C, D και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα PlGF (Placental Growth Factor).<sup>101</sup> Τα μέλη της οικογένειας αυτής περιέχουν μια επιφάνεια, η οποία σχηματίζεται από οκτώ κατάλοιπα κυστεΐνης, χαρακτηριστικά διαταγμένα στο χώρο.<sup>102</sup> Έχει περιγραφεί μια σειρά διαφορετικά αναδιατεταγμένων μορφών του VEGF-A και ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων που



περιλαμβάνουν, χαρακτηρίζονται ως ισομορφές 121, 145, 165, 183, 189 και 206.<sup>95</sup> Ο VEGF 165 είναι η πιο άφθονη ισομορφή. Οι μεγαλύτερες ισομορφές (189 και 206) έχουν στα άκρα τους αλκαλικά κατάλοιπα, τα οποία ενισχύουν τη σύνδεση με μόρια ηπαρίνης και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.<sup>103</sup>

Λίγα είναι γνωστά για τον VEGF-B, εκτός από το ρόλο του στην ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου. Οι VEGF-C και -D είναι ζωτικής σημασίας στην ανάπτυξη του λεμφαγγειακού συστήματος, αλλά μπορούν να επάγουν και την αγγειογένεση, όπως και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα.<sup>104</sup> Και οι δύο συντίθενται ως προ-πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούν μετα-μεταφραστική επεξεργασία. Για τον PlGF είναι γνωστό ότι εκφράζεται από πολλούς όγκους και σε διάφορες θέσεις παθολογικής αγγειογένεσης. Έχει υποθεθεί, ότι βοηθάει και ενισχύει τη δράση του VEGF-A, δημιουργώντας ετεροδιμερή με αυτόν.<sup>105</sup>

Πολλοί άλλοι αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και μικρά βιομόρια μπορούν να δημιουργήσουν νέα αιμοφόρα αγγεία.<sup>106-107</sup> Οι πλέον σημαντικοί είναι οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGF-1 και 2), ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), οι αγγειοποιητίνες (Ang-1 και 2), οι αυξητικοί παράγοντες μετασχηματισμού (TGF-a και b), η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), η λεπτίνη, οι προσταγλανδίνες και διάφορα λιπίδια. Η επιμέρους δράση πολλών εκ των παραγόντων αυτών αφορά, είτε στη ρύθμιση της έκφρασης του VEGF, είτε επάγουν διαδικασίες κυτταρικής μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και ωρίμανσης των αγγείων, ή έχουν ρυθμιστικό ρόλο στο φαινόμενο της αγγειακής διαπερατότητας.<sup>136</sup>

### 1.7.3 VEGF-A

Υπάρχουν πολλά κύτταρα (ηπατοκύτταρα, οστεοβλάστες, ουδετερόφιλα, μακροφάγα, αιμοπετάλια, CD34+, νευρικά, ενδοθηλιακά), αλλά και ιστοί (καρδιακός μυς, σκελετικοί μύες), που εκφράζουν τον VEGF.<sup>108</sup>

Ο VEGF-A είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 42 kDa περίπου, συνδεδεμένη με ένα δισουλφιδικό δεσμό και η οποία μεταγράφεται από ένα και μοναδικό γονίδιο.<sup>109</sup> Η έκφρασή του ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της υποξίας (μέσω του HIF-1 οδού), των κυτταροκινών, διαφόρων αυξητικών παραγόντων (όπως ο TGF-b), άλλων ορμονών (οιστρογόνα, προγεστερόνη), αλλά η σημαντικότερη έκφρασή του είναι αυτή που ανευρίσκεται σε διάφορα νεοπλάσματα και ρυθμίζεται μέσω ογκογονιδίων. Οι διάφορες ισομορφές του VEGF-A που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του RNA. Από αυτές, ξεχωρίζουν και έχουν την μεγαλύτερη σημασία τρεις μορφές, οι 189, 165 και 121.

Ο VEGF-A έχει διάφορες φυσιολογικές δράσεις, τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξη, όσο και την ενήλικη ζωή. Ο ρόλος του στην εμβρυική αγγειογένεση έχει σαφώς πιστοποιηθεί. Η στοχευμένη αφαίρεση ενός μόνο αλληλίου, από το αντίστοιχο γονίδιο, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές δυσλειτουργίες στην ανάπτυξη και οδηγεί στον θάνατο του εμβρύου.<sup>110</sup> Δρα ως μιτογόνο ή επαγωγέας της κυτταρικής μετανάστευσης και ως κρίσιμος παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι λειτουργίες αυτές σχετίζονται με διάφορα μόρια μεταγωγής σήματος, όπως οι πρωτεΐνες G, η κινάση της φωσφοινοσιτόλης-3 (PI3K), οι πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (MAP κινάσες) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO).<sup>102</sup> Στους ενήλικες, ο VEGF-A έχει σημαντικό ρόλο στην κυκλική αγγειογένεση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, συμβάλλει δε στη ρύθμιση της αιμοποιητικής ανάπτυξης και ως νευροτροφικός παράγοντας.

Από αρκετά χρόνια, ο VEGF-A έχει τύχει ιδιαίτερης προσοχής, λόγω της ανάμειξής του στην αγγειογένεση της ογκογένεσης και της πιθανής εμπλοκής του σε αντίστοιχα θεραπευτικά σχήματα.<sup>111</sup> Υπάρχουν πολλές μελέτες, οι οποίες αναδεικνύουν ότι ο VEGF-A και οι υποδοχείς του υπερεκφράζονται σε διάφορες μορφές νεοπλασμάτων. Έχει δειχθεί, πως μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του VEGF-A, είναι σε θέση να μειώνουν την αυξητική ικανότητα σε καρκινικών κυτταρικών μοντέλων.<sup>112</sup> Επιπρόσθετα, παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναδειχθεί και με άλλες μεθόδους αντιμετώπισης, που περιλαμβάνουν ανταγωνιστές του VEGF-A, αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια, ειδικούς αναστολείς της τυροσινικής κινάσης, και φάρμακα ή τοξίνες κατά των VEGF-A υποδοχέων. Ειδικά, για τη μεταστατική νόσο του καρκίνου του παχέος εντέρου υπάρχουν ήδη τέσσερις εγκεκριμένες θεραπείες, που στοχεύουν τον VEGF-A τόσο εξωκυττάρια όσο και ενδοκυττάρια.

Ο VEGF-A 165, είναι η πλέον κοινά εκφραζόμενη και μελετημένη ισομορφή, η οποία αρχικά ανακαλύφθηκε ως ένας ισχυρός παράγοντας της αγγειακής διαπερατότητας.<sup>113</sup> Η αυξημένη διαπερατότητα των μικρών αγγείων και οι επιπτώσεις της (οίδημα, πήξη του ινωδογόνου και δημιουργία προαγγειογενετικής γέλης ινώδους), αποτελούν χαρακτηριστικά των ποικίλων μορφών παθολογικής αγγειογένεσης που έχουν ήδη μελετηθεί.<sup>114,95</sup>

#### **1.7.4 Ισομορφές VEGF και δράσεις τους**

Οι διάφορες ισομορφές του VEGF-A ασκούν πολλές κοινές λειτουργίες. Διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μεταβιβάζουν σήματα για την επιβίωσή τους και επάγουν αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα.<sup>109</sup> Ειδικότερα, VEGF-A μεταβάλλει το μοτίβο της γονιδιακής έκφρασης: των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζοντας σημαντικό αριθμό μεταγραφικών παραγόντων, πρωτεϊνών σχετιζόμενων με το μηχανισμό πήξης (όπως του ιστικού

παράγοντα - TF) και την ινωδόλυση (uPA, tPA, PAI-1), της θεμέλιας ουσίας των μεταλλοπρωτεασών, των υποδοχέων των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT-1), της συνθάσης του νιτρικού οξέος, των αντιαποπτωτικών παραγόντων (bcl-2) και τέλος, των μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (E-selectin, ICAM-1, VCAM).<sup>115,116</sup>

Αν και επιδεικνύουν τις ίδιες δράσεις *in vitro*, οι ισομορφές του VEGF-A εμφανίζουν και διαφορές, τόσο στις χημικές, όσο και στις φυσικές ιδιότητές τους, οι οποίες επηρεάζουν τις λειτουργίες τους *in vivo*.<sup>117</sup> Στα ποντίκια οι ισομορφές του VEGF έχουν ένα αμινοξύ λιγότερο. Ο VEGF-A (164/5) είναι ένα θετικά φορτισμένο μόριο, το οποίο συνδέεται με την ηπαρίνη, που αρχικά απομονώθηκε με καθαρισμό σε στήλες συγγένειας ηπαρίνης.<sup>118</sup> Ο VEGF-A (188/9) συνδέεται περισσότερο ισχυρά με την ηπαρίνη, ενώ ο VEGF-A (120/1) δεν συνδέεται με την ηπαρίνη, διαχεόμενο ελεύθερα στους ιστούς.<sup>103</sup> Νέα, υπό δημιουργία αιμοφόρα αγγεία, πιστεύεται πως απαιτούν μεγάλου και μικρού εύρους καθοδηγητικές προτροπές για κατευθυνόμενη μετανάστευση. Ο VEGF-A (164/5), κυκλοφορεί σε δύο μορφές, την διαλυτή και τη συνδεδεμένη με την θεμέλια ουσία και μπορεί να ανταποκριθεί και στους δύο τύπους προτροπών. Ο VEGF-A (120/1) μπορεί να ασκήσει μεγάλου εύρους προτροπές, ενώ ο VEGF-A (188/9 μόνο μικρού εύρους). Αποτέλεσμα αυτών είναι, ότι όταν ο VEGF-A (120/1) είναι παρών, τα νέα αγγεία δεν έχουν μικρού εύρους καθοδηγητικές προτροπές και αποτυγχάνουν να διακλαδιστούν κατάλληλα. Από την άλλη πλευρά, όταν ο μοναδικός τύπος που ασκεί δράση είναι ο συνδεδεμένος με πρωτεογλυκάνη VEGF-A(188/9), τότε δεν υπάρχει μεγάλου εύρους βαθμιδωτή κλίση προσελκυστικών μορίων και έτσι τα ενδοθηλιακά κύτταρα παίρνουν λανθασμένα μηνύματα κατεύθυνσης. Ποντίκια γενετικώς μεταλλαγμένα που εκφράζουν μόνο τον VEGF-A (164) αναπτύσσονται φυσιολογικά, ενώ αυτά με τον VEGF-A (120) ή τον VEGF-A (188) μόνο, αναπτύσσουν βαρείας μορφής αγγειακές ανωμαλίες.<sup>105</sup> Ακόμα, σε ιστοπαθολογικά δείγματα ασθενών, όγκοι που εκφράζουν την μια ή την άλλη ισομορφή του VEGF-A μόνο, επάγουν διαφορετικού τύπου αγγειακά μοτίβα.<sup>119</sup>

### **1.7.5 Η οικογένεια των υποδοχέων VPF/VEGF και οι οδοί μεταβίβασης σήματος**

Οι υποδοχείς της οικογένειας του VEGF συμπεριλαμβάνουν τις κινάσες της τυροσίνης VEGF R1 (Flt-1), VEGF R2 (KDR ή Flk-1), και VEGF R3 (Flt-4), όλες μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του PDGF και των νευροπλινών (Np's).<sup>120</sup> Ο VEGF R1 ενώνεται με τους VEGF-A, VEGF-B και PlGF-1, ο VEGF R2 με τον VEGF-A, ενώ ο VEGF R3 δρα ως υποδοχέας για τους VEGF-C and D.<sup>102</sup> Ο υποδοχέας VEGF R2 φαίνεται να είναι ο πρωτογενής μεσολαβητής της αγγειογενετικής δράσης του VEGF-A. Η Np-1 δρα σαν συμπαράγοντας, ο οποίος ενισχύει την μέσω του VEGF χημειοταξία και τη συγγένεια με τον VEGF R2.<sup>120</sup> Άλλοι σημαντικοί

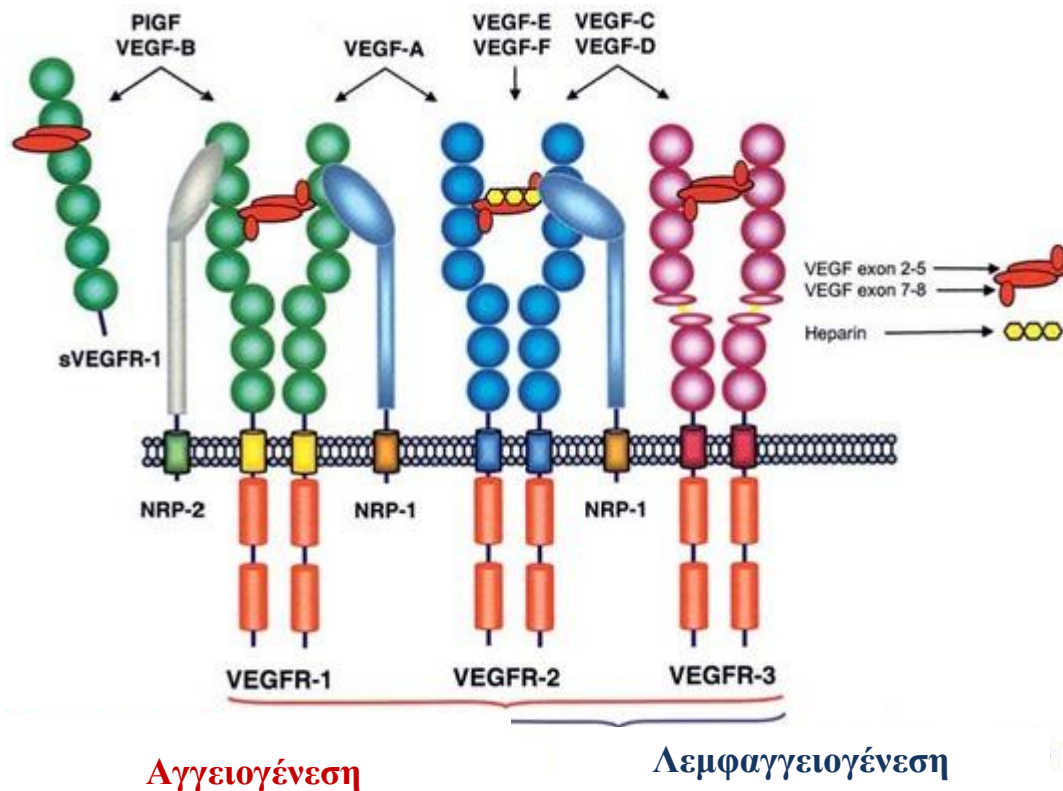
συμπαράγοντες του VEGF περιλαμβάνουν μέλη των οικογενειών των ιντεγκρινών (integrins) και των καντχερινών (candherins).<sup>102</sup>

### 1.7.6 Υποδοχείς του VEGF (VEGFR's)

Οι VEGFR-1 και 2, οι οποίοι εκφράζονται ευρέως στο φυσιολογικό αγγειακό ενδοθήλιο, υπερρυθμίζονται στην επαγόμενη από τον VEGF-A παθολογική αγγειογένεση.<sup>95</sup> Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι ο VEGF-A (165) διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων, από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία εκφράζουν παρόμοια τους υποδοχείς VEGFR-1 και 2.<sup>96</sup> Μια διαλυτή, μερικώς αποδομημένη, μορφή του VEGFR-1 (sFlt), η οποία είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος, υπάρχει στον ορό του αίματος και συγκρατεί τους VEGF-A και PlGF από τη σύνδεση και τη δράση τους. Η μερικώς αποδομημένη μορφή του VEGFR-1 υποστηρίζεται, ότι ενοχοποιείται για την προεκλαμψία, μια συχνή παρενέργεια της κύησης, που σχετίζεται με αγγειακές ανωμαλίες στους νεφρούς και άλλα όργανα.<sup>121</sup> Ο VEGFR-1 εκφράζεται ακόμα στα λεία μυϊκά κύτταρα του ουροποιητικού<sup>115</sup> και σε μονοκύτταρα, τα οποία συμβάλλουν σε πολλές παθολογικές μορφές αγγειογένεσης, εκφράζοντας είτε τον VEGF-A, είτε άλλες κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες.<sup>122</sup> Οι Miao, Lee, και Lin σε μελέτη τους αναφέρουν, ότι οι υποδοχείς του VEGF-A και ειδικά οι VEGFR-1 και Nrp-1, εκφράζονται σε μερικούς τύπους καρκινικών κυττάρων, προτείνοντας μια αυτοκρινή οδό, η οποία μπορεί να ενεργοποιεί την αύξηση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων.<sup>151</sup>

Ο VEGFR-2 υποτίθεται ότι είναι ενδιάμεσος μεσολαβητής, στις περισσότερες από τις αγγειογεννητικές λειτουργίες του VEGF-A, που περιλαμβάνουν αυξημένη ροή ασβεστίου και πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>123</sup> Κατά τη σύνδεση του VEGF-A με τον VEGFR-2, ενεργοποιείται μια σειρά από γεγονότα μεταγωγής σήματος, που ξεκινά με τον διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, ακολουθούμενη από φωσφορυλίωση αρκετών πρωτεϊνών, όπως η πρωτεϊνική κινάση C, η φωσφολιπάση και η PI3K. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από τον VEGF-A είναι και η σερίνη/θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση A, η οποία ρυθμίζει την επιβίωση και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>124</sup> Πολύ πρόσφατα οι πρωτεΐνες G έχουν ενοχοποιηθεί στη μεταγωγή του σήματος μέσω του VEGF-A. Αν και η σύνδεση του VEGF-A είναι υψηλής συγγένειας, ο ρόλος του υποδοχέα VEGFR-1 στη μεταγωγή του σήματος στο αγγειακό ενδοθήλιο είναι λιγότερο εμφανής και μπορεί μάλιστα να είναι και ανασταλτικός. Αποδείξεις για αυτό έρχονται από μελέτες, στις οποίες ποντίκια που δεν έχουν τον υποδοχέα VEGFR-1, αναπτύσσουν αγγειακό ενδοθήλιο αυξημένου βαθμού, καθώς και από μελέτες καλλιιεργειών με ενδοθηλιακά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον VEGFR-1.<sup>123</sup>

Η Nrp-1 μπορεί ίσως να ρυθμίζει τη βιοδραστικότητα του VEGF-A, ανεξάρτητα από τη σχέση της με τους άλλους υποδοχείς. Τέτοιες δράσεις συμπεριλαμβάνουν την μέσω Nrp-1 εξαρτημένη ενδοθηλιακή μετανάστευση και την αγγειογένεση και ανάπτυξη της καρδιάς.<sup>125</sup> Η Nrp-1 ενώνεται με τον VEGF-A (164/5), αλλά όχι με τον VEGF-A (120/1).<sup>120</sup> Έχει μόνο μια μικρή ενδοκυττάρια ουρά και θεωρείται πως λειτουργεί ως συνυποδοχέας, εντείνοντας τη σύνδεση του VEGF-A (164/5) στον VEGFR-2. Όμως, πρόσφατα αποτελέσματα μελέτης δείχνουν, ότι τουλάχιστον *in vitro*, η Nrp-1 μπορεί να μεσολαβήσει στη μεταγωγή του σήματος μόνη της και ανεξάρτητα από τον VEGFR-2, οδηγώντας σε μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίς να υπάρχει πολλαπλασιασμός.<sup>125</sup> Στο Σχήμα 3 φαίνονται οι υποδοχείς των VEGF και η εξωκυττάρια σύνδεση τους για τη μεταγωγή του σήματος.



**Σχήμα 3.**

Η οικογένεια των VEGF υποδοχέων και οι περιοχές εξωκυττάριας σύνδεσης τους, με τα μόρια του VEGF.  
*sVEGFR-1*: διαλυτός VEGFR-1, *NRP-1,2*: Νευροπιλίνη-1,2.

### 1.7.7 Η αγγειογένεση και το σύστημα πήξης

Η ενεργοποίηση της πήξης, η αγγειακή θρόμβωση και η εναπόθεση εξωαγγειακού ινώδους, αποτελούν αρχικά βήματα της αγγειογεννητικής απάντησης που επάγεται από τον παραγόμενο από νεοπλασματικά κύτταρα VEGF-A (164), αλλά και κατά την φλεγμονή και την επούλωση τραύματος.<sup>120</sup> Είτε ενδαγγειακά, είτε εξωαγγειακά, ο πηκτικός μηχανισμός ενεργοποιείται από τον

ιστικό παράγοντα (Tissue Factor: TF) και οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (με απελευθέρωση ποικίλων αυξητικών παραγόντων) και στη δημιουργία θρομβίνης και ινώδους, καταστάσεις με προαγγειογενετικές ιδιότητες. Σε διάφορα νεοπλάσματα, έχει αναδειχθεί στενή συσχέτιση της μικροαγγειακής πυκνότητας και της έκφρασης των TF και VEGF-A. Πρόσφατα αποτελέσματα μελετών δείχνουν, ότι ο TF μπορεί να επηρεάζει την αγγειογένεση με μηχανισμούς που δεν σχετίζονται με την διαδικασία της πήξης, επάγοντας την έκφραση του VEGF-A και αναστέλλοντας τη μεταγραφή της θρομβοσπονδίνης 2, που είναι αναστολέας της αγγειογένεσης.<sup>126</sup> Η επαγόμενη από τον TF υπερέκφραση του VEGF-A έχει τη δυναμική να επάγει με την σειρά της μια αυτοδιεγερόμενη ανατροφοδότηση του όλου συστήματος.<sup>127</sup> Επιπρόσθετες αποδείξεις της επαγόμενης από τον TF έκφρασης του VEGF-A, προέρχονται από πειράματα σε ποντικούς με απουσία των γονιδίων του TF. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, τα πειραματόζωα καταλήγουν κατά την 10<sup>η</sup> μέρα της εμβρυϊκής ζωής, από ανωμαλίες της αγγειακής τους ακεραιότητας, πολύ νωρίτερα δηλαδή από τον χρόνο στον οποίο το σύστημα πήξης καθίσταται λειτουργικό.<sup>128,110</sup> Επίσης, ο αναστολέας της ενεργοποίησης του TF (Tissue Factor Pathway Inhibitor: TFPI), φαίνεται να αναστέλλει τα αγγειογενετικά χαρακτηριστικά διαφόρων καρκινικών σειρών, όπως μελανώματος, παχέος εντέρου και πνεύμονα.<sup>129</sup> Είναι σημαντικό να τονισθεί, πως οι ασθενείς με συμπαγείς όγκους, εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντος TFPI. Τέλος, ένας αντιαγγειογενετικός ρόλος έχει προταθεί και για ένα δεύτερο αναστολέα του TF, τον TFPI-2.<sup>129</sup>

Η έκφραση του VEGF-A αυξάνει ως απάντηση στην υποξία και εξαρτάται από τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων της υποξίας HIF-1α και HIF-2α.<sup>130</sup> Η μεταγραφή του ελαττώνεται σε νορμοξαιμία, ως αποτέλεσμα αποδόμησης του HIF-1α, αλλά ακόμη και τότε μπορεί να ενεργοποιηθεί από ογκογονίδια (π.χ. H-ras), διάφορες κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (π.χ. Epidermal Growth Factor: EGF, Fibroblast Growth Factor-4: FGF-4, Platelet-Derived Growth Factor: PDGF και Transforming Growth Factor-β: TGF-β).<sup>160,161</sup>

### **1.7.8 Η θρομβίνη και ο αγγειογενετικός της ρόλος**

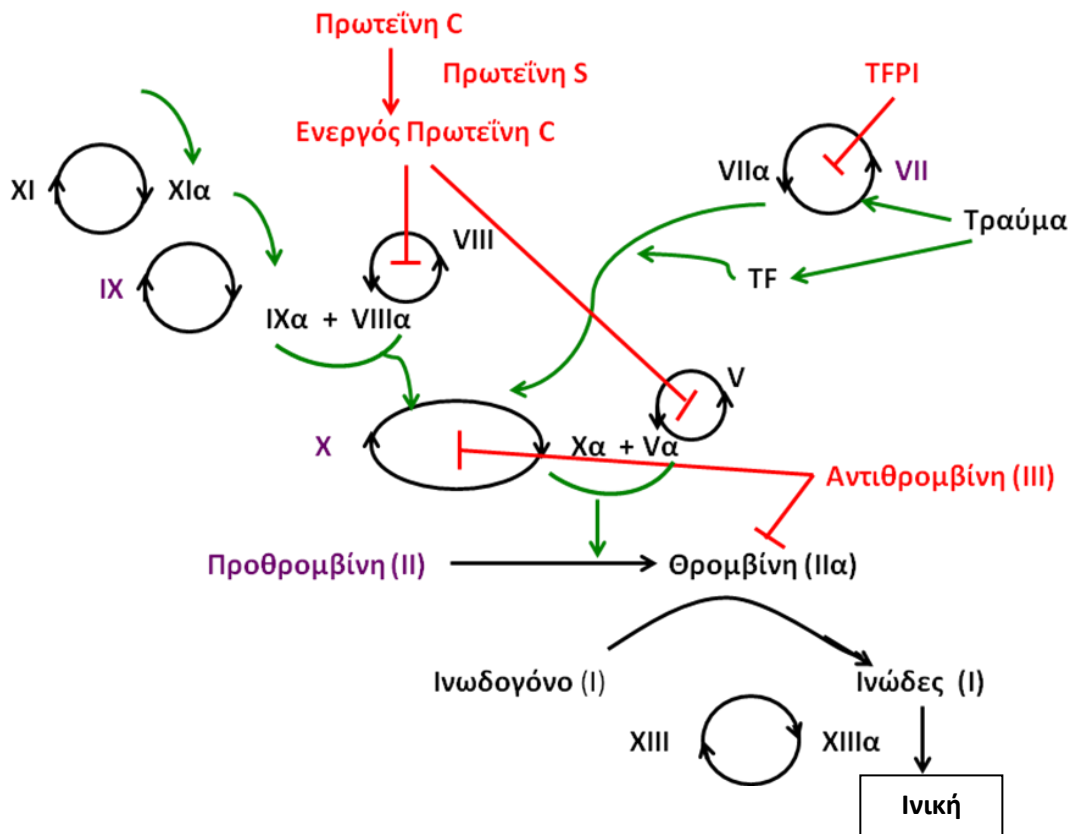
Έχει βρεθεί ότι η θρομβίνη, εκτός από τη δράση της στην πήξη και τη δημιουργία του ινώδους, διαδραματίζει και ένα σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Ενεργοποιεί τους υποδοχείς PARs (Protease-Activated Receptors), οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια πολλών διαφορετικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>132</sup> Η ενεργοποίηση των PARs οδηγεί στην απελευθέρωση από τα αιμοπετάλια των αποθηκευμένων αυξητικών παραγόντων, στη μεταγραφή των σχετιζόμενων με την αγγειογένεση γονιδίων, στην αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων από την βασική μεμβράνη (πρώιμο βήμα στην

κυτταρική μετανάστευση), στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών, στην αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και τέλος στην έναρξη και επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης.<sup>133,129</sup>

Το μόριο της θρομβίνης μεταβάλλει τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, αυξάνοντας την έκφραση της υποομάδας  $\beta_3$  της ιντεγκρίνης  $\alpha_v\beta_3$ , που είναι παρούσα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων των όγκων.<sup>129</sup> Η  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη εκφράζεται από το ενδοθηλιακό επικάλυμμα σε αιμοφόρα αγγεία που τροφοδοτούν τους όγκους. Είναι μια ιντεγκρίνη με τα τμήματα να είναι ελεύθερα προς το εσωτερικό του αυλού οπότε και αλληλεπιδρά με ποικίλα υποστρώματα που περιλαμβάνουν το ινώδες, την φιβρονεκτίνη, την βιτρονεκτίνη, και την θρομβοσπονδίνη.<sup>134</sup> Μόρια που ενώνονται με την  $\alpha_v\beta_3$  επάγουν ενδοκυττάρια σήματα που ευνοούν την κυτταρική σύνδεση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό και προλαμβάνουν την απόπτωση.<sup>134</sup> Πρόσφατα, η θρομβίνη έχει προταθεί ως ένας επιπρόσθετος συνδέτης της  $\alpha_v\beta_3$  επειδή ενδοθηλιακά κύτταρα που καλλιεργούνται σε τριβλία επιστρωμένα με θρομβίνη προστατεύονται από την απόπτωση.<sup>133</sup>

Πρόκειται για μια ιντεγκρίνη, της οποίας τμήματά της είναι ελεύθερα προς το εσωτερικό του αυλού, αλληλεπιδρώντας με ποικίλα υποστρώματα, όπως το ινώδες, η φιβρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη.<sup>134</sup> Μόρια που ενώνονται με την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$ , επάγουν ενδοκυττάρια σήματα που ευνοούν την κυτταρική σύνδεση, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό και προλαμβάνουν την απόπτωση. Πρόσφατα, έχει προταθεί, πως και η θρομβίνη συνδέεται με αυτή.<sup>133</sup>

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός, πως η θρομβίνη μπορεί να έχει ακόμη και αντιαγγειογενετικές ιδιότητες.<sup>133</sup> Η αντιθρομβίνη III (ATIII) μπορεί να αναστείλει τον επαγόμενο από τη θρομβίνη και τον VEGF-A κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το προένζυμο της θρομβίνης, η προθρομβίνη, έχει και αυτό αντιαγγειογενετικές ιδιότητες.<sup>133,135</sup> Τέλος, μέσω σύνδεσης της θρομβίνης με την θρομβομοντουλίνη (Thrombomodulin: TM), ενεργοποιείται η ενδογενής αντιθρομβωτική πρωτεΐνη C, η οποία με τη σειρά της απενεργοποιεί το σύμπλεγμα προθρομβινάσης (F VIIIa, F Va, ιόντα  $\text{Ca}^{++}$ ), αναστέλλοντας την πήξη. Ο VEGF-A αυξάνει τη σύνθεση της TM και οδηγεί σε συνολική μείωση της δραστηριότητας του συστήματος πήξης. Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της πήξης και οι φυσικοί αναστολείς της.



**Σχήμα 4.**

Ο μηχανισμός της πήξης. Η ενδογενής οδός (δεξιά) και η εξωγενής οδός (αριστερά).

Μωβ χρώμα: οι παράγοντες πήξης, που εξαρτώνται από την βιταμίνη Κ. Κόκκινο χρώμα οι φυσικοί αναστολείς της πήξης.

### 1.7.9 Άλλες αγγειογενετικές πρωτεΐνες

Η ουροκινάση, διάφορες άλλες ινωδολυτικές πρωτεΐνες, αλλά και οι πρωτεάσες του μηχανισμού πήξης, διαδραματίζουν το δικό τους ρόλο στην αγγειογένεση. Ποντικοί με έλλειψη των γονιδίων της ουροκινάσης και του πλασμινογόνου, έχουν δυσλειτουργική αγγειογένεση.<sup>136</sup> Επιπρόσθετα, τουλάχιστον έξι πρωτεΐνες του αιμοστατικού μηχανισμού περιέχουν τμήματα με αντιαγγειογενετικές δράσεις, όπως η αγγειοστατίνη, τμήμα της ATIII, ο πέμπτος επίτοπος του υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνου και τμήματα της προθρομβίνης 1 και 2.<sup>137</sup>

### 1.7.10 Αιμοπετάλια και VEGF

Τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα συνωστίζονται σε περιοχές ενδοθηλιακού τραυματισμού ή αθηροσκλήρωσης. Αυτό οδηγεί σε δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα η ροή του αίματος να γίνεται μη φυσιολογική και έτσι να δημιουργούνται θρόμβοι από αιμοπετάλια. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες έχουν αναφερθεί ως διαμεσολαβητές της αγγειογενετικής διαδικασίας. Τα αιμοπετάλια περιέχουν PDGF, EGF, TGF-α και TGF-β και έχουν υψηλές συγκεντρώσεις VEGF, ενός σημαντικού διεγέρτη της αγγειογένεσης,



που μπορεί να ελευθερωθεί μετά από διέγερση *in vitro* και κατά τη διάρκεια της αιμοστατικής απάντησης. Τα μεγακαρυοκύτταρα εκφράζουν mRNA (messenger ribonucleic acid) που μεταγράφει τους τρεις ισότυπους του VEGF (121, 165, και 189 αμινοξέα),<sup>138</sup> και η ανοσοαποτύπωση έχει αναγνωρίσει πρωτεϊνικά τμήματα VEGF με μοριακά βάρη 34000Da και 44000Da στα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα εκφράζουν το γονιδιακό μεταγράφημα για τον υποδοχέα του VEGF, που ορίζεται ως KDR/Flt-2.<sup>139</sup>

Τα αιμοπετάλια περιέχουν υψηλά επίπεδα του VEGF και έχει υπάρξουν πολλές ενδείξεις, πως αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στην αμφιβληστροειδοπάθεια εκ πολλαπλασιασμού, στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, αλλά και στην αύξηση και τη μεταστατική διαδικασία πολλών κακοήθων νεοπλασμάτων.<sup>170,171</sup>

Ο VEGF μπορεί να ανιχνευθεί σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος και ορού. Τα υψηλότερα επίπεδα μετρώνται σε δείγματα ορού, λόγω της απελευθέρωσής του από τα αιμοπετάλια, κατά τη φυγοκέντρηση.<sup>108</sup> Στη μελέτη τους ο Arisato και *et al*, δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια στον ορό του αίματος και στο πλάσμα διαφέρουν σημαντικά ως προς τη συγκέντρωση τους για τον VEGF.<sup>141</sup> Στην ίδια μελέτη, με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού σε επιστρώσεις μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα, αποδεικνύεται ότι ο VEGF είναι διάχυτος στο κυτταρόπλασμα των μεγακαρυοκυττάρων.<sup>141</sup> Σε κυτταρομετρία ροής αιμοπεταλίων, με αντίσωμα για τον VEGF, αποδείχθηκε ότι ο VEGF είναι συγκεντρωμένος στο κυτταρόπλασμα και ελάχιστος έως απών στην κυτταρική μεμβράνη. Σε ανοσοϊστοχημική χρώση για τον VEGF, σε αιμοπεταλιακό αιμοστατικό βύσμα, σαφώς αποδεικνύεται, πως το σχηματισθέν δίκτυο ινώδους φέρει τη χρώση με το VEGF-αντίσωμα.<sup>141</sup> Αυτό δείχνει, ότι ο VEGF που ελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια ανιχνεύεται στο σημείο της δράσης του.

Σε εργαστηριακή μέτρηση του VEGF από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) και σε φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα (PPP), αναδεικνύεται ότι στο πρώτο υπάρχει υψηλότερη συγκέντρωση του παράγοντα αυτού. Ακόμα έχει αναφερθεί ότι τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν την ηκτηνίνη Α (μια μεταλλοπρωτεΐνη τύπου 2, MMP-2), που η ελευθέρωση της επηρεάζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.<sup>142</sup> Η MMP-2 ανήκει στην ομάδα των μεταλλοπρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην ανακατασκευή της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας. Η ηκτηνίνη Α αυξάνει τη συγκέντρωση του VEGF, που προέρχεται από τα αιμοπετάλια.<sup>141</sup>

Στην μελέτη τους οι Martini, Riondino and Basili αποδεικνύουν, ότι η *in vivo* ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα VEGF στο πλάσμα.<sup>143</sup> Στη μελέτη αυτή, αυξημένα επίπεδα VEGF αντιστοιχούσαν σε ασθενείς με αθηρωματικούς παράγοντες κινδύνου,

χωρίς όμως την παρουσία αθηρωματικής νόσου ή σοβαρής αθηροσκλήρωσης. Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vitro* και *ex vivo* με θρομβίνη, απελευθερώνει VEGF. Έτσι, σε 70 ασθενείς χωρίς αθηρωματική νόσο, με τουλάχιστον ένα παράγοντα κινδύνου (κάπνισμα, υπέρταση, υπερχοληστερολομία ή συνδυασμός των παραπάνω), μετρήθηκε ο VEGF, η soluble-(s) P-selectin (δείκτης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων) και τα σύμπλοκα θρομβίνης-αντιθρομβίνης (thrombin-antithrombin complexes: TAT), που είναι δείκτες ενεργοποίησης της πήξης.<sup>143</sup> Στους ασθενείς αυτούς, οι τιμές του VEGF κυμαίνονταν από πολύ χαμηλές (κάτω των 5 pg/mL), έως τον μέσο όρο των 15.1 pg/mL.<sup>143</sup> Οι ασθενείς οι οποίοι είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα του VEGF, είχαν υψηλότερες τιμές για την sP-selectin, σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν μη ανιχνεύσιμες τιμές VEGF.<sup>143</sup> Μελέτη συσχέτισης του VEGF, της sP-selectin και των αιμοπεταλίων έδειξε, ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ αυτών, αλλά όχι με τα σύμπλοκα TAT. Είναι γνωστό, ότι τα αιμοπετάλια κατά τη συγκόλλησή τους εκκρίνουν VEGF *in vivo*, και ότι *in vitro* και *in vivo* μελέτες με το μόριο της sP-selectin δείχνουν, ότι αυτό εκφράζεται στις μεμβράνες των οργανιδίων του κυτταροπλάσματος των αιμοπεταλίων. Η διαλυτή του μορφή εμφανίζεται μόνο υπό την παρουσία άλλων κυττάρων του αίματος, κάνοντας το μόριο αυτό δύσκολο να ενεργοποιηθεί σε *in vitro* κατάσταση.<sup>143</sup>

## 1.8 Ηπαρίνες Μικρού Μοριακού Βάρους (LMWHs)

Ο καρκίνος είναι μια χρόνια κατάσταση υπερπηκτικότητας στην οποία αυξάνεται ο κίνδυνος φλεβικής θρομβοεμβολής (ΦΘΕ).<sup>144,145</sup> Είναι αποδεδειγμένο ότι άλλοι συμπαράγοντες, όπως η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία, η ακινητοποίηση και η χρήση κεντρικών φλεβικών καθετήρων, μπορεί να αυξήσουν περαιτέρω τον κίνδυνο της ΦΘΕ. Παρότι, υπάρχουν σαφείς οδηγίες, σχετικά με την αναγκαιότητα θρομβοπροφύλαξης και τα αποδεκτά φαρμακευτικά σχήματα, για τους ογκολογικούς ασθενείς, που πρόκειται να χειρουργηθούν, δεν συμβαίνει το ίδιο, για τη βέλτιστη στρατηγική που αφορά στη θεραπεία τυχόν θρομβοεμβολικού επεισοδίου σε ασθενή με ενεργό καρκίνο.

Θεραπευτικά σχήματα γνωστών φαρμάκων έχουν εφαρμοσθεί, αλλά και νέα φάρμακα έχουν αναπτυχθεί, στην προσπάθεια βελτιστοποίησης της αποτελεσματικότητάς τους, σε νεοπλασματικούς ασθενείς. Ενδιαφέρον είναι, πως για πολλούς από αυτούς τους παράγοντες υπήρξαν ενδείξεις πιθανής εμπλοκής τους, στην εξέλιξη της νόσου και την επιβίωση των ασθενών.

Η ευεργετική επίδραση της θρομβοπροφύλαξης με LMWH, σε ασθενείς με καρκίνο, εκτιμήθηκε σε μια post-hoc ανάλυση της μελέτης MEDENOX, στην οποία 72 ασθενείς έλαβαν 40

mg ενοξαπαρίνης, άπαξ ημερησίως. Σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο, φάνηκε μια μείωση του ποσοστού θρομβοεμβολικών επεισοδίων, από 20% σε 10%.<sup>146</sup>

Επίσης, δυο συστηματικές ανασκοπήσεις κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι κάποια μορφή προφύλαξης είναι απαραίτητη σε ογκολογικούς ασθενείς, που φέρουν κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, παρότι λόγω αδυναμιών των μελετών που συμπεριλήφθησαν, δεν μπορούν να εξαχθούν οριστικά συμπεράσματα.<sup>147-148</sup>

### 1.8.1 Ηπαρίνες Μικρού Μοριακού Βάρους και καρκίνος

Η θρόμβωση και ο καρκίνος μοιάζουν να είναι δυο αλληλένδετα γεγονότα, με τις πρώτες αναφορές να έρχονται ακόμη και από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Ιστορική είναι αυτή του Καθηγητή Armand Trousseau (1801-1867), για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης θρόμβωσης σε ασθενείς με καρκίνο.<sup>149</sup> Χαρακτηριστικά ανέφερε: «Σε άλλες περιπτώσεις, στις οποίες η έλλειψη παρουσίας όγκου με έκανε να διστάζω ως προς τη φύση της ασθένειας, οι αμφιβολίες μου απομακρύνθηκαν και ήξερα ότι η ασθένεια είναι καρκίνος, όταν επώδυνο οίδημα με φλεγμονή εμφανιζόταν σε ένα από τα σκέλη.» Είναι γνωστό ότι δυο χρόνια αργότερα ο A. Trousseau έγραφε σε μαθητή του με έκπληξη: «Τα έχω χάσει ... η φλεγμονή που εμφανίστηκε απόψε δεν μου αφήνει καμία αμφιβολία ως προς την φύση του νοσήματος από την οποία πάσχω.» Ένα χρόνο αργότερα απεβίωσε νικημένος από τον καρκίνο του στομάχου.

Σήμερα είναι καλά αποδεδειγμένο, πως το σύνδρομο Trousseau χρησιμοποιείται για να περιγράψει ασθενείς με παρουσία φλεβικής θρόμβωσης, οι οποίοι μπορεί να υποκρύπτουν νεοπλασματική νόσο. Η θρόμβωση μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη του νεοπλάσματος, ή να εμφανίζεται κατά τη διάρκεια θεραπευτικών πράξεων, όπως χειρουργική επέμβαση, χορήγηση αντινεοπλασματικών φαρμάκων, παρατεταμένη νοσηλεία κ.λ.π.<sup>150</sup> Από πολλές μελέτες έχει φανεί, πως η χορήγηση LMWH σε νεοπλασματικούς ασθενείς, μπορεί να προσφέρει κάποιο σχετικό όφελος στην επιβίωση. Είναι όμως φανερό, πως απαιτούνται περισσότερες, μεγαλύτερες, τυχαιοποιημένες προοπτικές μελέτες, για να προσδιοριστεί επακριβώς ο λόγος του κόστους/οφέλους, που συσχετίζεται με τη χρήση τους.<sup>148</sup>

Αρκετές post hoc μελέτες έχουν δείξει την ευεργετική επίδραση των LMWHs στην επιβίωση των ασθενών με καρκίνο και συνυπάρχουσα VTE.<sup>151,152</sup> Οι μηχανισμοί πίσω από αυτά τα ευρήματα είναι ακόμα ατελώς κατανοητοί, αλλά μπορεί να σχετίζονται με τη δράση των LMWHs στο μηχανισμό πήξης, στην αγγειογενετική, αλλά ίσως και στη μεταστατική διαδικασία.<sup>153-154</sup> Οι διαρθρωτικές μεταβολές και το μήκος της αλυσίδας των LMWHs, μπορεί να οδηγούν σε διαφορετική αντινεοπλασματική δράση.<sup>155,156</sup>

Σε υποανάλυση της μελέτης CLOT δεν βρέθηκε κανένα όφελος στην επιβίωση, κατά το τέλος του 1<sup>ου</sup> έτους, που να σχετίζεται με τη χορήγηση δαλταπαρίνης για έξι μήνες, σε σύγκριση με την αντίστοιχου χρόνου χορήγηση από του στόματος κουμαρινικών.<sup>157</sup> Ωστόσο, στην υποομάδα των ασθενών με μη μεταστατικό νόσο (n = 150), η δελταπαρίνη έδειξε σημαντικά παρατεταμένη επιβίωση, με μείωση του σχετικού κινδύνου στο 0,50 (CI: 95%, 0,27 - 0,95), σε σύγκριση με τα από του στόματος κουμαρινικά, ενώ σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση της θνησιμότητας, τουλάχιστον.<sup>190-191</sup>

Άλλες μελέτες έχουν αξιολογήσει τις επιδράσεις των LMWHs σε ασθενείς με καρκίνο, χωρίς την παρουσία θρόμβωσης. Στη μελέτη FAMOUS, ασθενείς με προχωρημένη κακοήθη νόσο, τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν, είτε LMWH σε προφυλακτική δόση, είτε εικονικό φάρμακο, για ένα έτος. Στην κύρια ανάλυση του συνόλου των ομάδων, καμία διαφορά στην επιβίωση δεν παρατηρήθηκε, μεταξύ των δύο ομάδων. Όμως, όπως και στη μελέτη CLOT, και εδώ η υποομάδα των ασθενών με καρκίνο καλής πρόγνωσης ωφελήθηκε από άποψη επιβίωσης.<sup>158</sup>

Σε μια διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, οι ασθενείς με διάγνωση ανεγχείρητης συμπαγούς κακοήθειας, τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 6 εβδομάδες LMWH ή εικονικό φάρμακο. Η χορήγηση LMWH παρέτεινε σημαντικά την επιβίωση, σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, με τη μεγαλύτερη διαφορά υπέρ της υποομάδας των ασθενών με την πρόβλεψη της καλύτερης πρόγνωσης κατά την αρχική εκτίμηση. Η μέση επιβίωση ήταν 8 μήνες στο σκέλος της ναδροπαρίνης, έναντι 6,6 μηνών στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Ο σχετικός κίνδυνος θνησιμότητας ήταν 0,75 (CI: 95%, 0,59-0,96), για την ομάδα μελέτης, χωρίς σημαντική διαφορά στο ποσοστό επιπλοκών, όπως μείζονα αιμορραγικά συμβάματα (3% vs. 1% - P = 0,12).<sup>159</sup> Επιπρόσθετα, μελέτες παρατήρησης έχουν προτείνει βελτίωση της επιβίωσης για ασθενείς με κακοήθη μελανώματα που λαμβάνουν LMWH.<sup>160</sup> Τέλος, σε πιλοτική μελέτη για τις LMWH σε προχωρημένο καρκίνο του παγκρέατος, έχει αναφερθεί, ότι αυτές ενισχύουν την αντινεοπλασματική δράση της χημειοθεραπείας, οδηγώντας σε αυξημένα ποσοστά επιβίωσης μετά το πρώτο έτος, σε σύγκριση με τη χορήγηση χημειοθεραπείας μόνο (47,7% vs. 13,5% - P = 0,029).<sup>148</sup>



## **2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 2.1 Στόχος της μελέτης

Στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της τινζαπαρίνης (Tinzaparin: Innohep<sup>®</sup>, Leo Pharma) στην περιεγχειρητική διακύμανση των επιπέδων του VEGF-A, καθώς και στο μηχανισμό της πήξης, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, που υποβάλλονται σε θεραπευτική εκτομή (R0).

Σε αυτήν την μελέτη, ασθενείς με μη μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, τυχαιοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες. Σε όλους τους ασθενείς η περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη ξεκίνησε την ημέρα προ του προγραμματισμένου χειρουργείου και χορηγήθηκε άπαξ ημερησίως, υποδόρια. Στην **ομάδα I**, οι ασθενείς έλαβαν δόση τινζαπαρίνης 3.500 IU, στην **ομάδα II** την ίδια δόση, αλλά για μακρό διάστημα 30 ημερών (ακόμη και μετά την έξοδό τους από το Νοσοκομείο). Στην **ομάδα III**, η δόση ήταν υψηλότερη (4.500 IU τινζαπαρίνης) και χορηγήθηκε για 10 ημέρες, ενώ τέλος στην **ομάδα IV**, η ίδια υψηλή δόση χορηγήθηκε για τη μακρά περίοδο των 30 ημερών.

Κριτήρια αποκλεισμού καθορίστηκαν να είναι το ιστορικό: άλλης κακοήθειας, ισχαιμικής καρδιοπάθειας, περιφερικής αποφρακτικής αγγειοπάθειας και θρομβοεμβολικών επεισοδίων. Επίσης, η ύπαρξη σακχαρώδους διαβήτη, η λήψη αντιπηκτικών ή/και αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων, όπως επίσης και η εκ των υστέρων διαπίστωση κοινών συγγενών θρομβοφιλιών, που σχετίζονται με ομόζυγες μεταλλάξεις στον παράγοντα V του μηχανισμού πήξης (V Leiden), στο γονίδιο της προθρομβίνης (G20210A) και στο γονίδιο MTHFR.

Συνολικά, αρχικά συμπεριλήφθηκαν 76 ασθενείς, τελικά όμως αναλύθηκαν τα αποτελέσματα 59 εξ' αυτών (17 ασθενείς αποκλείστηκαν της μελέτης, για λόγους που θα αναφερθούν παρακάτω). Αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν: την ημέρα προ του χειρουργείου (pre-op day), τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day) και την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική μέρα (30<sup>th</sup> post-op day). Στα δείγματα αίματος, όρου και πλάσματος έγιναν και οι κοινά πραγματοποιούμενες εξετάσεις (γενική αίματος, χρόνοι πήξης), αλλά και μελέτη των επιπέδων VEGF-A 165, των αντιθρομβωτικών πρωτεϊνών C και AT III, όπως επίσης και του παράγοντα VIII του μηχανισμού πήξης. Επίσης, μέσω γενετικής ανάλυσης (PCR) αποκλείστηκε ή διαπιστώθηκε η ύπαρξη των ομόζυγων μεταλλάξεων που αναφέρθηκαν παραπάνω.

## 2.2 Υλικό και μέθοδοι

### 2.2.1 Κριτήρια ένταξης/αποκλεισμού και έγγραφη συναίνεση

Στη μελέτη εντάχθηκαν συνεχείς ασθενείς της Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στους οποίους υπήρχε προεγχειρητική διάγνωση αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου, χωρίς ενδείξεις μεταστατικής νόσου από τον προεγχειρητικό έλεγχο σταδιοποίησης. Όλοι οι

ασθενείς αυτοί επρόκειτο να υποβληθούν σε ερευνητική λαπαροτομία, με στόχο τη θεραπευτική εκτομή (R0).

Τα κριτήρια αποκλεισμού για τους ασθενείς στην μελέτη περιελάμβαναν, τη λήψη αντιπηκτικών ή και αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων (για οποιαδήποτε αιτία), τη σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια (τιμές GFR <30ml/min), το ιστορικό οποιασδήποτε νεοπλασίας, σοβαρής χρόνιας πάθησης, λήψης χημειοθεραπείας ή ακτινοβολίας, όπως επίσης και το ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη, ισχαιμικής καρδιοπάθειας ή στηθάγχης προσπαθείας, περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας, θρομβοεμβολικού επεισοδίου και τέλος, γνωστή διαταραχή πήξεως. Ορισμένες από αυτές τις καταστάσεις, δεν μπορούσαν παρά να διαγνωσθούν μετά την πρώτη αιμοληψία, άρα αφού είχαν ήδη ενταχθεί στη μελέτη, όπως για παράδειγμα ασθενείς που στη γενετική τους ανάλυση, για μεταλλάξεις θρομβοφιλίας, εμφάνιζαν ομοζυγωτία για τα γονίδια του παράγοντα V (V Leiden), προθρομβίνης (prothrombin G20210A) και MTHFR. Οι ασθενείς αυτοί εξαιρούνταν της μελέτης, ευθύς μόλις γίνονταν η διαπίστωση της θρομβοφιλίας.

Όσοι επρόκειτο να λάβουν μέρος στην έρευνα, ενημερώνονταν διεξοδικά και σε απόφαση συμμετοχής τους υπέγραφαν το έγγραφο συναίνεσης για την εθελοντική τους συμμετοχή (παράρτημα Α – Έντυπο Συγκατάθεσης). Επίσης, σε ειδικό έντυπο (παράρτημα Β) συμπληρώνονταν πληροφορίες που αφορούσαν τη γενική κατάσταση του ασθενούς, τη φυσική τους κατάσταση, το ατομικό και κληρονομικό ιστορικό, τις διαιτολογικές τους συνήθειες και τις τυχόν συννοσηρότητες. Μετά τη χειρουργική επέμβαση, συλλέγονταν και καταγράφονταν όλες οι πληροφορίες σχετικά, με το είδος της επέμβασης, τη μετεγχειρητική αγωγή, τις τυχόν επιπλοκές, την ιστολογική έκθεση, κλπ.

### 2.2.2 Σχεδιασμός της μελέτης

Βάσει του σχεδιασμού της μελέτης, 15 ασθενείς επρόκειτο να ενταχθούν σε κάθε μια από τις τέσσερις ομάδες μελέτης. Οι ασθενείς εισέρχονταν στην ομάδα I, μέχρι τη συμπλήρωση του επιθυμητού αριθμού και μετέπειτα στην επόμενη ομάδα, κ.ο.κ. Αυτό έγινε προς αποφυγή του σφάλματος που δημιουργείται από μη τυχαioποιημένη επιλογή (selection biased).

Όλοι οι ασθενείς έλαβαν περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη με τινζαπαρίνη, η χορήγηση της οποίας ξεκινούσε την παραμονή του χειρουργείου και συνεχίζονταν άπαξ ημερησίως. Η δόση και η διάρκεια της προφύλαξης είχε ως ακολούθως: **ομάδα I** (δόση τινζαπαρίνης 3.500 IU, για 10 ημέρες), **ομάδα II** (δόση τινζαπαρίνης 3.500 IU, για 30 ημέρες), **ομάδα III** (δόση τινζαπαρίνης 4.500 IU, για 10 ημέρες) και **ομάδα IV** (δόση τινζαπαρίνης 4.500 IU, για 30 ημέρες).



Κατά την εισαγωγή των ασθενών στην κλινική και προ της χειρουργικής επέμβασης (pre-op day) λαμβάνονταν δείγματα αίματος για γενικό αιματολογικό έλεγχο, έλεγχο νεφρικής και ηπατικής λειτουργίας έλεγχο πηκτικού μηχανισμού (χρόνος προθρομβίνης: INR, χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης: aPTT και επίπεδα ινωδογόνου) και για γενετική ανάλυση (PCR). Από φυγοκέντρηση ολικού αίματος σε κιτρικά αντιπηκτικά, συλλέχθηκε πλάσμα για έλεγχο των πρωτεϊνών C και αντιθρομβίνης III, και του παράγοντα πήξης VIII. Από δείγματα ορού, έπειτα από φυγοκέντρηση, έγινε μέτρηση για τα επίπεδα του VEGF-A 165. Αιμοληψίες γίνονταν επίσης απαραίτητα τις πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες, για την παρακολούθηση του ασθενούς, αλλά επίσης οπωσδήποτε τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day) και την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (30<sup>th</sup> post-op day), βάσει του πρωτοκόλλου της μελέτης, για έλεγχο των πρωτεϊνών πήξης και του VEGF-A.

Οι ασθενείς παρακολουθούνταν καθημερινά μέχρι την έξοδό τους από το Νοσοκομείο και ύστερα μέχρι τη συμπλήρωση του πρώτου μετεγχειρητικού μήνα σε τακτική βάση, στα εξωτερικά ιατρεία της Χειρουργικής Κλινικής.

Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Συνολικά 76 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν στη μελέτη. 17 από τους ασθενείς αποκλείστηκαν, για τους κάτωθι λόγους: σε 6 δεν αποδείχθηκε ύπαρξη κακοήθειας στην τελική ιστολογική αναφορά, σε 4 εμφανίσθηκαν επιπλοκές που δεν επέτρεπαν τη συνέχιση χορήγησης LMWH και σε ένα ασθενή διαπιστώθηκε διεγχειρητικά μεταστατική νόσος, μη αναγνωρισθείσα κατά την προεγχειρητική σταδιοποίηση. Επίσης, 3 ασθενείς δεν προσήλθαν για αιμοληψία την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα και τέλος 3 ασθενείς εμφάνισαν ομοζυγωτία για τους βασικούς παράγοντες θρομβοφιλίας (2 με V Leiden και 1 με Prothrombin G20210A). Τελικά, 59 συνολικά ασθενείς αποτέλεσαν τις τέσσερις ομάδες της μελέτης, 11 στην ομάδα I, 15 στην ομάδα II, 13 στην ομάδα III και 15 στην ομάδα IV.

### **2.2.3 Συλλογή δειγμάτων και αποθήκευση**

Τα δείγματα ολικού αίματος, ορού και πλάσματος συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας τη συνήθη τεχνική φλεβικής παρακέντησης. Τα δείγματα ορού συλλέχθηκαν σε σωλήνες χωρίς αντιπηκτικά και με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η αιμόλυση. Το δείγμα παρέμενε στο σωληνάριο για να πήξει, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για τουλάχιστον 15 λεπτά. Ο ορός διαχωρίζονταν με φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές ανά λεπτό, για 20 λεπτά, χωρίς τη χρήση του φρένου της φυγόκεντρου, για να αποφευχθεί η ανάδυσή του. Η θερμοκρασία της φυγόκεντρου είχε οριστεί στους 4 °C, για τα 20 λεπτά της φυγοκέντρησης. Μετέπειτα τα δείγματα ορού

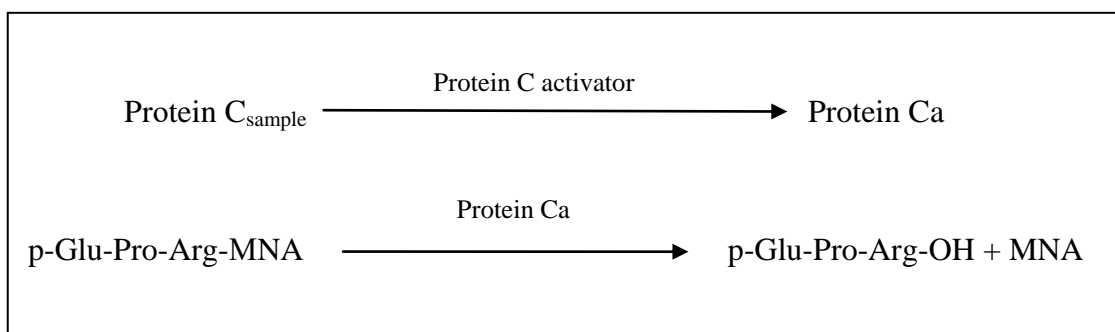
διαχωρίζονταν σε τρία ξεχωριστά φιαλίδια πολυαιθυλενίου και αποθηκεύονταν στους  $-76^{\circ}\text{C}$ , έως και 12 εβδομάδες, μέχρι τη τελική ανάλυσή τους. Για τα δείγματα πλάσματος, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια, με τη διαφορά, ότι τα δείγματα ελήφθησαν σε σωληνάκια με κίτρινα αντιπηκτικά. Τα δείγματα πλάσματος για τον έλεγχο των πρωτεϊνών της πήξης, αποθηκεύονταν και αυτά στους  $-76^{\circ}\text{C}$  έως και 12 εβδομάδες, μέχρι την ανάλυσή τους. Για τη γενετική ανάλυση και την παρουσία ή τον αποκλεισμό των μεταλλάξεων, η αποθήκευση δείγματος ολικού αίματος γίνονταν σε σωληνάκια με παρουσία EDTA.

## 2.3 Εργαστηριακές μέθοδοι

Ο προσδιορισμός των αντιθρομβωτικών πρωτεϊνών C και αντιθρομβίνης III και του παράγοντα VIII του μηχανισμού πήξης, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια χρωματογραφικών μεθόδων, στο αυτοματοποιημένο σύστημα της Dade Behring BCS.

### 2.3.1 Πρωτεΐνη C

Η πρωτεΐνη C (protein C) είναι μια εξαρτώμενη από την βιταμίνη-K πρωτεΐνη, που όταν ενεργοποιείται (protein Ca), δρα ως ενδογενής αντιθρομβωτικός παράγοντας, αναστέλλοντας τη διαδικασία της πήξης, μέσω ρύθμισης της ενεργότητας των παραγόντων V και VIII του καταρράκτη της πήξης. Η έλλειψή της, που συνήθως οφείλεται σε συγγενή ετεροζυγωτία, οδηγεί σε υψηλό κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικών επεισοδίων. Επιπλέον, μπορεί να οφείλεται και σε επίκτητες διαταραχές, όπως η χορήγηση αντιπηκτικών ή διαταραχές της απορρόφησής της στον εντερικό αυλό. Σε δείγμα πλάσματος, η protein C ενεργοποιείται μέσω ειδικού ενεργοποιητή, που παράγεται από δηλητηρίου φιδιού. Η ενεργοποιημένη protein C μετράται χημικά, μέσω ενός κινητικού τεστ (μέτρηση χρόνου), με υπολογισμό της αύξησης της απορρόφησής της στα 405 nm. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι:



- Protein C Activator: Παράγωγο από δηλητηρίου του φιδιού *Agkistrodon contortrix*, σταθεροποιημένο και λυόφιλο

- HEPES ρυθμιστικό διάλυμα: HEPES 25mmol/L, polyethylene glycol (2,5g/L), caesium chloride (5g/L), pH 8.25: συντηρητικό νατριούχο αζίδιο (<1g/L).
- Αντιδραστήρια υποστρώματος: πυρο-γλουταμικό οξύ – protein-arg-methoxy-nitroanilide (MNA,) λυόφιλο με συγκέντρωση μετά την διάλυση 4 mmol/L.

Όλα τα αντιδραστήρια χρειάζεται να έρθουν σε θερμοκρασία +37 °C. Σε ειδικά διαμορφωμένα τρυβλία προστίθενται 100μL πλάσματος προς εξέταση, και 1.000 μL protein C Activator, τα οποία αναμιγνύονται και αφήνονται να επωαστούν στους +37 °C, για 5 λεπτά. Στο διάλυμα προστίθενται 200 μL διαλύματος υποστρώματος.

Τα τελικό διάλυμα αναμιγνύεται και προσδιορίζεται η  $\Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min}$ . Μετά από 15sec μετράται η απορρόφηση και ξεκινά η μέτρηση. Μετά από 60 και 120 sec μετράται ξανά η απορρόφηση και προσδιορίζεται η αντίστοιχη τιμή  $\Delta A/\text{min}$  με αφαίρεση, και μετά υπολογίζεται η μέση τιμή των δυο μετρήσεων  $\Delta A$ .

$$F_L = \frac{\text{Ορισθείσα τιμή (\% του φυσιολογικού) πλάσματος αναφοράς}}{\Delta A/\text{min πλάσματος αναφοράς}}$$

Πολλαπλασιάζοντας το  $\Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min}$  των δειγμάτων με τον παράγοντα  $F_L$ , η τιμή της protein C του δείγματος υπολογίζεται σε ποσοστό % του φυσιολογικού.

$$\text{Protein C δείγματος (\% του φυσιολογικού)} = F_L \times \Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min πλάσματος αναφοράς}$$

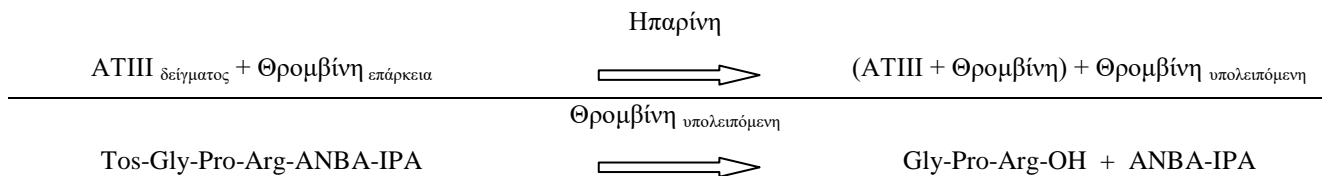
Για τις μετρήσεις κάθε δείγματος, απαιτείται ανθρώπινο πλάσμα γνωστής συγκέντρωσης (standard human plasma), και τα δείγματα έλεγχου (control N: φυσιολογικό δείγμα και control P: παθολογικό δείγμα), των οποίων οι τιμές είναι γνωστές. Πάντα σε κάθε μέτρηση τα δυο δείγματα ελέγχου μετρώνται τουλάχιστον 2 φορές και αφού βρεθούν εντός των ορίων, τότε ξεκινά η μέτρηση των δειγμάτων των ασθενών.

### 2.3.2 Αντιθρομβίνη III

Η αντιθρομβίνη III (ATIII) ανήκει και αυτή στο σύμπλεγμα των ενδογενών αντιθρομβωτικών πρωτεϊνών και αποτελεί έναν αναστολέα της θρομβίνης και του ενεργοποιημένου παράγοντα X (Xa) στο πλάσμα. Η AT III δημιουργεί ένα μη αναστρέψιμο σύμπλοκο με τα ένζυμα αυτά. Η σύνδεσή της με ένα μόριο ηπαρίνης, αυξάνει κατακόρυφα την απενεργοποίηση των ενεργοποιημένων παραγόντων της πήξης (μέχρι και 1.000 φορές). Η μέτρηση της AT III γίνεται για τη διάγνωση των κληρονομούμενων και επίκτητων ανεπαρκειών της, οι οποίες οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Επίκτητη ανεπάρκεια της AT III συχνά εμφανίζεται ως αποτέλεσμα κατανάλωσής της, στη διάρκεια μεγάλων χειρουργικών επεμβάσεων, ή λόγω διάχυτης

ενδαγγειακής πήξης στα πλαίσια σήψης, νεφρίτιδος, παρεγχυματικών βλαβών του ήπατος (ηπατίτιδα, φαρμακευτική ηπατίτιδα, αλκοολισμός) και από χρήση οιστρογόνων.

Η ΑΤ III μετατρέπεται από την ηπαρίνη σε ένα ενδιάμεσο αναστολέα και απενεργοποιεί τη θρομβίνη του δείγματος. Η υπολειπόμενη θρομβίνη που υπάρχει στο δείγμα, προσδιορίζεται με πείραμα κινητικής, το οποίο υπολογίζει την αύξηση την απορρόφησής της στα 405 nm:



- Θρομβίνη: αγελαδινή, λυόφιλη με προσθήκη ηπαρίνης και απροτινίνης.
- Αντιδραστήριο υποστρώματος: λυόφιλο σε μορφή διαλύματος. Περιέχει Tosylglycyl-L-prol-L-arginyl-5-amino-2-nitrobenzoic acid- isopropylamide 4 mmol/L.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Tris (100mmol/L), NaCl (6.7 g/L) pH 8.2.

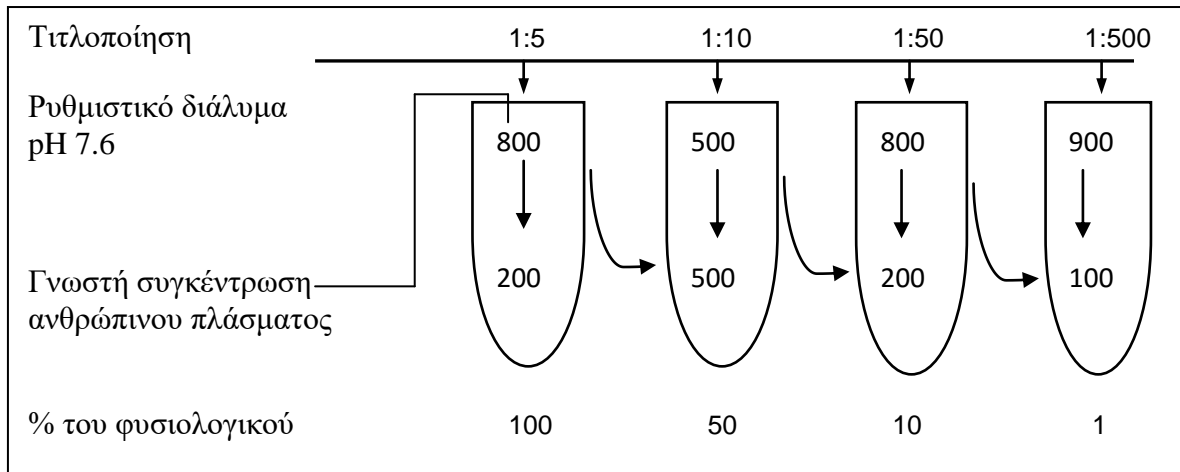
Όλα τα αντιδραστήρια χρειάζεται να έρθουν σε θερμοκρασία +37 °C. Σε ειδικά διαμορφωμένα τρυβλία, προστίθενται 1μL πλάσματος προς εξέταση από λήψη σε κιτρικά, και 60 μL διαλύματος αντιδραστηρίου θρομβίνης. Το μείγμα αφήνεται να αναμειχθεί για 3 λεπτά στους +37 °C. Στο μείγμα που προκύπτει προστίθενται 10μL αντιδραστηρίου υποστρώματος. Τα τελικό διάλυμα αναμιγνύεται και προσδιορίζεται η  $\Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min}$ . Η ανάλυση γίνεται αυτόματα στον αναλυτή. Για τις μετρήσεις κάθε δείγματος χρειάζονται τα δείγματα ελέγχου (control N: φυσιολογικό δείγμα και control P: παθολογικό δείγμα), των οποίων οι τιμές είναι γνωστές. Σε κάθε μέτρηση πάντα τα δύο δείγματα ελέγχου μετρώνται 2 φορές και αφού βρεθούν εντός των ορίων τότε ξεκινά η μέτρηση των δειγμάτων ασθενών. Τα φυσιολογικά επίπεδα της ΑΤ III αναφέρονται ως ποσοστά ενεργότητας, με φυσιολογικά όρια 75 – 125%.

### 2.3.3 Παράγοντας VIII

Δείγμα πλάσματος στο οποίο έχει αφαιρεθεί ο παράγων VIII, έχει ως αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT). Έτσι, έχοντας δείγματα πλάσματος με απουσία συγκεκριμένων παραγόντων πήξης, μπορούμε να προσδιορίσουμε την έλλειψη κάποιου από αυτούς, στο δείγμα πλάσματος ασθενών. Όταν αναμιγνύεται το πλάσμα του ασθενούς, με το δείγμα στο οποίο απουσιάζει ένας συγκεκριμένος παράγοντας, θα υπάρξει παράταση του aPTT, μόνο εάν και τα δυο δείγματα δεν έχουν ένα συγκεκριμένο παράγοντα, έτσι ώστε να συνεχίζεται ο καταρράκτης της πήξης. Το δείγμα προσδιορίζεται από την ανάμειξή του, με δείγμα πλάσματος που έχει γνωστή συγκέντρωση σε διαφορετικές τιτλοποιήσεις, με τη χρήση μιας

καμπύλης αναφοράς για τις τιμές των συγκεντρώσεων του γνωστού πλάσματος. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιείται για πολλούς παράγοντες πήξης, αρκεί να έχουμε πάντα το δείγμα με τον παράγοντα σε ανεπάρκεια.

Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται ανθρώπινο πλάσμα γνωστής συγκέντρωσης. Με την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης ή ακετοξικού διέθυλο-βαρβιτουρικού, δημιουργούνται τιτλοποιήσεις για τον προσδιορισμό των χρόνων πήξης.



Αντιδραστήρια που απαιτούνται για την μέτρηση του F VIII:

- *Dade Actin: Ενεργοποιημένη Κεφαλοπλαστίνη*
- *CaCl<sub>2</sub> - Χλωριούχο ασβέστιο 0.025mmol/L*
- *Ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζόλης ή ακετοξικού διέθυλο-βαρβιτουρικού και ρυθμιστικά διαλύματα της Dade.*
- *Ανθρώπινο πλάσμα γνωστής συγκέντρωσης, και τα διαλύματα control N και control P φυσιολογικής και παθολογικής τιμής αντίστοιχα.*

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του δείγματος, χρειάζεται η γραφική παράσταση των χρόνων πήξης, που προσδιορίζονται σε λογαριθμική κλίμακα, ενάντια στις αντίστοιχες τιμές των ποσοστών της ενεργότητας των παραγόντων πήξης. Για την μέτρηση κάθε δείγματος απαιτούνται 100  $\mu$ L πλάσματος, χωρίς τον προς εξέταση παράγοντα, 100  $\mu$ L δείγματος (1:5 ήδη αραιωμένο με ρυθμιστικό διάλυμα) και 100  $\mu$ L αντιδραστηρίου aPTT. Το μείγμα αφήνεται να επωαστεί για 2 λεπτά και έπειτα προστίθενται 100  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>, οπότε και ξεκινά η μέτρηση, έως ότου το νεφελόμετρο προσδιορίσει το χρόνο πήξης. Τα αποτελέσματα παίρνονται από την καμπύλη αναφοράς, σε επί τοις εκατό κλίμακα του φυσιολογικού. Εάν είναι μικρότερα από 100%, τότε η τιμή από την καμπύλη πολλαπλασιάζεται με το δεκαδικό αριθμό (π.χ. για τιμή 95% πολλαπλασιάζεται η τιμή που λαμβάνεται από την καμπύλη με 0.95). Εάν η τιμή του aPTT αντιστοιχεί σε ποσοστό μεγαλύτερο από 100%, το δείγμα του ασθενούς πρέπει να αραιωθεί 1:10 και η τιμή αυτή μετέπειτα πολλαπλασιάζεται με 2 για το τελικό ποσοστό της ενεργότητας.

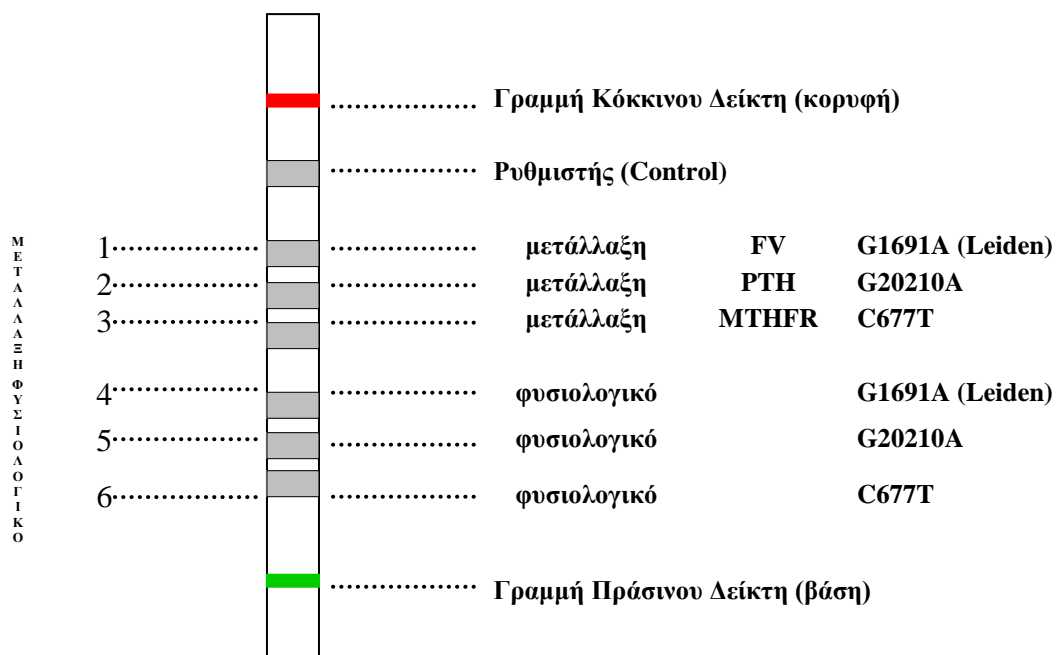
Για τις μετρήσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα της Dade-Behring. Για όλες τις πρωτεΐνες της πήξης και πριν από τη μέτρηση, το αυτοματοποιημένο σύστημα υπολογίζει τα δείγματα ελέγχου που παρέχονται από την εταιρεία. Με την προϋπόθεση, πως οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου, βρίσκονται εντός των επιτρεπτών από τον κατασκευαστή ορίων, στο αυτοματοποιημένο σύστημα δημιουργείται η παραδεκτή καμπύλη ελέγχου των δειγμάτων.

### 2.3.4 Μεταλλάξεις παράγοντα V (V Leiden), προθρομβίνης (Prothrombin G20210A) και MTHFR, με τη χρήση της ταινίας μεθόδου της Vienna Lab

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία βήματα: α) απομόνωση DNA, β) ενίσχυση με PCR (χρησιμοποιώντας βιοτυλιωμένους εκκινητές) και γ) υβριδισμό των ενισχυμένων προϊόντων σε μια λωρίδα ανίχνευσης, που περιέχει ειδικά για το αλληλίο ολιγονουκλεοτίδια, καθηλωμένα σε παράταξη παραλλήλων γραμμών (Σχήμα 5). Οι συνδεδεμένες βιοτυλιωμένες αλληλουχίες ανιχνεύονται, χρησιμοποιώντας streptavidin-αλκαλική φωσφατάση και χρωματισμένα υποστρώματα.

Η μέθοδος καλύπτει 3 μεταλλάξεις: του γονιδίου του παράγοντα V (V Leiden: G1691A), της προθρομβίνης (G20210A) και της MTHFR (Methylene tetrahydrofolate reductase: C677T). Στο Σχήμα 5 αναδεικνύεται ο τρόπος εξέτασης με τη χρήση της ταινίας εξέτασης.

**Σχήμα 5. Σχεδιασμός της Ταινίας Εξέτασης**



Το DNAT περιέχει διάλυμα NaOH 1.6%, διάλυμα ενίσχυσης, ρυθμιστικό διάλυμα (Taq πολυμεράσης), διάλυμα σύζευξης αλληλουχιών, διάλυμα έκπλυσης (0.05% NaN<sub>3</sub>) και συζευκτικό διάλυμα (treptavidin-αλκαλική φωσφατάση). Το διάλυμα για την ανάπτυξη χρώματος περιέχει κυανούν νιτρο-τετραζόλιο (NBT) και 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολο φωσφορικό (BCIP). Επιπρόσθετα του βασικού εξοπλισμού του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας χρειάζονται:

- Φυγόκεντρος από 3.000 – 12.000 rpm (1.000 – 12.000 X g)
- Επωαστήρας ή λουτρό θερμαινόμενο με δυνατότητα από 56°C έως 98°C
- Θερμαντήρας κυκλικής θέρμανσης και κατάλληλα σωληνάκια
- Taq DNA πολυμεράση
- Θερμόλουτρο με ικανότητα ανάδευσης με θερμοκρασία 45°C
- Συσκευές αναρρόφησης και αναδευτήρας

Χρησιμοποιείται φρέσκο ή κατεψυγμένο αίμα με EDTA ή κιτρικό αντιπηκτικό (αποφεύγεται αίμα που περιέχει ηπαρίνη). Ο χρόνος αποθήκευσης είναι έως 3 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή περίπου 1 εβδομάδα σε 2-8° C προ της χρήσης. Αίμα το οποίο διατηρήθηκε κατεψυγμένο για παραπάνω από έναν χρόνο, ή που υπέστη περισσότερους από τρεις κύκλους ψύξης- απόψυξης, θεωρείται ακατάλληλο να χρησιμοποιηθεί σε αυτή τη διαδικασία.

Τα δείγματα αίματος έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου, με καλή ανάδευση και αναστρέφοντάς τα προσεχτικά αρκετές φορές. Επιτρέπουμε στο διάλυμα λύσης και την ρητίνη GEN<sup>X</sup> TRACT να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

- Λαμβάνονται 100 μl δείγμα αίματος σε μικροσωληνίσκο όγκου 1,5 ml με βιδωτό πόμα.
- Προσθέτουμε 1 ml διάλυμα λύσης, κλείνουμε το σωλήνα και αναδεύουμε με περιστροφικές κινήσεις αρκετές φορές
- Αφήνουμε όρθιο το σωληνάριο, για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Κάνουμε μικροφυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 3,000 rpm (περίπου 1,000 x g)
- Αφαιρούμε και απομακρύνουμε 1 ml από το υπερκείμενο
- Προσθέτουμε 1 ml διάλυμα λύσης, κλείνουμε το σωλήνα και αναδεύουμε με περιστροφικές κινήσεις αρκετές φορές
- Κάνουμε μικροφυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 12,000 rpm (περίπου 12,000 x g)
- Αφαιρούμε και απομακρύνουμε το υπερκείμενο με εξαίρεση περίπου 50 μl του εμφανούς ιζήματος
- Δημιουργούμε ξανά εναιώρημα της ρητίνης GEN<sup>X</sup> TRACT αναδεύοντας το μπουκάλι πλήρως
- Προσθέτουμε, στο ίζημα, 200 μl ρητίνης GEN<sup>X</sup> TRACT. Κλείνουμε το σωλήνα και τον αναδεύουμε για 10 δευτερόλεπτα. Το GEN<sup>X</sup> TRACT Resin κατακάθεται γρήγορα. Επαναλαμβάνουμε το εναιώρημα κάθε φορά, αμέσως προ της αφαίρεσης κλάσματος
- Θερμαίνουμε για 20 λεπτά στους 56°C και αναδεύουμε για 10 δευτερόλεπτα
- Θερμαίνουμε για 10 λεπτά στους 98°C και αναδεύουμε για 10 δευτερόλεπτα
- Κάνουμε μικροφυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 12,000 rpm και ψύχουμε σε πάγο

Το υπερκείμενο που προκύπτει περιέχει περίγραμμα του DNA, κατάλληλο για άμεση χρήση PCR. Για περαιτέρω φύλαξη, θα πρέπει να μεταφερθεί σε ένα φρέσκο σωλήνα και να διατηρηθεί σε κατάψυξη (2-8° C μέχρι μία εβδομάδα), ή να καταψυχθεί στους -20° C.

Όλα τα αντιδραστήρια και τα πρότυπα DNA παραμένουν κατεψυγμένα και όλα τα βήματα μέχρι την έναρξη της κυκλικής αναθέρμανσης, γίνονται σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε πάγο.

Αρχικά ετοιμάζεται ένα φρέσκο διάλυμα σε αραιώση 0.2U/μl Taq DNA πολυμεράσης, σε ρυθμιστικό διάλυμα Taq. Για κάθε δείγμα προς εξέταση ένα σωληνάριο προετοιμάζεται για ενίσχυση και τα σωληνάρια τοποθετούνται στον πάγο. Για κάθε δείγμα προετοιμάζεται ένα τελικό μείγμα τελικής αντίδρασης PCR, με:

- 15μl μείγματος ενίσχυσης
- 5μl αραιωμένης Taq DNA πολυμεράσης (1U)
- 5μl DNA προτύπου
- Τα σωληνάρια σφραγίζονται και ο θερμοκός ανακυκλωτής της ζεσταίνεται στους 94°C.
- Τα σωληνάρια τοποθετούνται στο μηχάνημα και το ακόλουθο πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας χρησιμοποιείται: Προ-PCR 94°C /2 λεπτά, Εναλλαγές θερμοκρασίας: 94°C/15 δευτ - 58°C/30 δευτ 72°C/30 δευτ (30 κύκλοι)
- Τελική επιμήκυνση 72 °C/3 λεπτά

Η στάθμη του νερού του υδατόλουτρου πρέπει να είναι περίπου στο ήμισυ του ύψους του δίσκου αποτύπωσης. Το υδατόλουτρο θερμαίνεται στους 45°C ακριβώς ( $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ). Ελέγχεται η θερμοκρασία με ένα βαθμονομημένο θερμόμετρο. Προθερμαίνονται το ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού και το διάλυμα πλύσεων A, στους 45 °C. Όλα τα καθιζήματα που έχουν δημιουργηθεί στους 2-8 °C, πρέπει να έχουν διαλυθεί. Οι ταινίες εξέτασης του DNA των δειγμάτων, τα DNAT, το διάλυμα σύζευξης, το διάλυμα πλύσεων B και το διάλυμα ανάπτυξης χρώματος, πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ παράλληλα ετοιμάζεται ο δίσκος αποτύπωσης. Κάθε ταινία εξέτασης, για κάθε δείγμα, αφαιρείται με λαβίδα, χρησιμοποιώντας γάντια και σημειώνουμε καθένα από αυτά με μολύβι.

- Βάζουμε 10 μl DNAT διαλύματος σε κάθε γωνιά κάθε λωρίδας εξέτασης στο δίσκο αποτύπωσης (μια γραμμή ανά δείγμα).
- Προσθέτουμε 10 μl του προϊόντος ενίσχυσης στο αντίστοιχο σημείο που βάλουμε το διάλυμα DNAT και αναμειγνύουμε με την πιπέτα. (Το διάλυμα παραμένει μπλε)
- Αφήνουμε το μείγμα να ηρεμήσει για 5 λεπτά
- Προσθέτουμε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος (προθερμαίνουμε στους 45°C) σε κάθε λωρίδα εξέτασης, οπότε και αναδεύουμε το δείγματα ήπια
- Τοποθετούμε τις ταινίες εξέτασης με την σηματοδοτημένη πλευρά επάνω στις αντίστοιχες λωρίδες. Οι ταινίες βυθίζονται τελείως στο διάλυμα
- Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 45°C στον αναδευτήρα, εντός του υδατόλουτρου. Ο αναδευτήρας τοποθετείται σε συχνότητα 50 rpm, έτσι ώστε να αποφευχθεί η απώλεια του διαλύματος. Το πόμα του υδατόλουτρου παραμένει κλειστό σε όλη την διαδικασία, για να αποφευχθούν μεταβολές στην θερμοκρασία
- Στο τέλος της επώασης αφαιρούνται τα διαλύματα υβριδοποίησης, με αναρρόφηση και γρήγορες κινήσεις, έτσι ώστε να μη στεγνώσουν οι λωρίδες εξέτασης. Περιοριστικό Διάλυμα (45°C - σε υδατόλουτρο με αναδευτήρα)
- Προσθέτουμε 1ml διαλύματος πλύσης A (προθερμασμένο στους 45°C). Ξεπλένουμε (10δευτ)και αφαιρούμε το υγρό με αναρρόφηση
- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος πλύσεων A (45 °C)
- Επωάζουμε για 15 λεπτά στους 45°C, στο κινούμενο υδατόλουτρο.
- Αφαιρούμε το υγρό με αναρρόφηση.
- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος πλύσεων A (45 °C)
- Επωάζουμε για 15 λεπτά, στους 45°C, στο κινούμενο υδατόλουτρο
- Αφαιρούμε το υγρό με αναρρόφηση



Για την ανάπτυξη χρώματος στην ταινίας εξέτασης:

- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος σύζευξης
- Επωάζουμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε αναδευτήρα
- Αφαιρούμε το υγρό διάλυμα με αναρρόφηση
- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος πλύσεων Β και ξεπλένουμε (10δευτ).
- Αφαιρούμε το υγρό με αναρρόφηση.
- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος πλύσεων Β
- Επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα δείγματα είναι στον αναδευτήρα
- Αφαιρούμε το υγρό με αναρρόφηση.
- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος πλύσεων Β
- Επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα δείγματα είναι στον αναδευτήρα
- Αφαιρούμε το υγρό με αναρρόφηση.
- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος ανάπτυξης χρώματος
- Επωάζουμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι σε αναδευτήρα. Ένα μωβ χρώμα θα αναπτυχθεί σε περίπτωση που υπάρχει θετική αντίδραση
- Οι ταινίες εξέτασης πλένονται αρκετές φορές με αποσταγμένο νερό
- Αφήνουμε τις ταινίες να στεγνώσουν στο σκοτάδι σε απορροφητικό χαρτί
- Οι ταινίες δεν πρέπει να εκτεθούν σε έντονο φως μετά την ανάπτυξη χρώματος

Για τον προσδιορισμό του γονότυπου ενός δείγματος χρησιμοποιείται το Collector™ sheet. Τοποθετείται η επεξεργασμένη λωρίδα εκτίμησης, σε ένα από τα καθορισμένα πεδία, ευθυγραμμίζοντάς την στο σχηματικό προσδιορισμένο πρότυπο, χρησιμοποιώντας την κόκκινη γραμμή στην κορυφή και την πράσινη στη βάση και μονιμοποιείται με κολλητική ταινία. Μια θετική αντίδραση της κορυφαίας γραμμής του δείγματος αναφοράς, υποδεικνύει τη σωστή λειτουργία του διαλύματος σύζευξης (Conjugate Solution) και του χρώματος αναφοράς. Αυτή η γραμμή πρέπει πάντα να είναι χρωματισμένη.

Για κάθε θέση πολυμορφισμού, μια από τις παρακάτω εικόνες αποτύπωσης πρέπει να λαμβάνεται:

ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ			
	NOR	HET	HOM
Γραμμή μετάλλαξης .....			
Γραμμή αγρίου τύπου.....			
	Γραμμή Αγρίου Τύπου	Γραμμή μετάλλαξης	Γενότυπος
	<b>Θετικό</b>	Αρνητικό	Φυσιολογικό
	<b>Θετικό</b>	<b>Θετικό</b>	Ετερόζυγος
	Αρνητικό	<b>Θετικό</b>	Ομόζυγος Μεταλλαγμένος

**Σχήμα 6.**

Ανάλυση των αποτελεσμάτων του γονιδιακού ελέγχου.

### 2.3.5 Επίπεδα VEGF-A 165

Για λόγους συντόμευσης αντί του VEGF-A 165 θα χρησιμοποιούμε το ακρωνύμιο VEGF. Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιεί την ποσοτική τεχνική ανοσοανίχνευσης, μέσω ενζύμου με αντισώματα που συνδέονται ως σάντουιτς. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τον VEGF έχει προ-επικαλυφθεί πάνω σε μια πλάκα πολλαπλών τρυβλίων. Τα πρότυπα δείγματα και τα δείγματα μέτρησης εγχέονται με πιπέτα, εντός των τρυβλίων και η τυχόν παρουσία VEGF δεσμεύεται από τα ακινητοποιημένα αντισώματα επάνω στην πλάκα. Μετά το ξέπλυμα, οποιαδήποτε από τις μη συνδεδεμένες ουσίες εντός του τρυβλίου αφαιρείται και ένα πολυκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για τον VEGF και συνδεδεμένο με ένζυμο, προστίθεται στα φρεάτια. Αφού γίνει ξανά πλύση για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένου πολυκλωνικού αντισώματος-ενζύμου, ένα διάλυμα υποστρώματος προστίθεται στα φρεάτια και το χρώμα αναπτύσσεται ανάλογα με την ποσότητα του VEGF που έχει δεσμευτεί στο αρχικό στάδιο. Η ανάπτυξη του χρώματος διακόπτεται και η ένταση του χρώματος μετράται.

Το τεστ για την εξέταση αυτή χρησιμοποιήθηκε για ερευνητικούς σκοπούς και εντός της ημερομηνίας λήξης. Κατά την εκτέλεση των μετρήσεων δεν υπήρξαν δείγματα με τιμές υψηλότερες, από ότι τα υψηλότερα πρότυπα και δεν έγιναν αραιώσεις. Σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα παρεμβολής στις μετρήσεις, από διαλυτούς υποδοχείς, πρωτεΐνες δέσμευσης και άλλους παράγοντες που υπάρχουν σε βιολογικά δείγματα, παρόλο που έχουν παρθεί όλα τα μέτρα αποφυγής της. Στον Πίνακα 1 αναγράφονται τα απαραίτητα υλικά για τη μέτρηση των επιπέδων του VEGF.

<b>VEGF Μικρο-Πλάκα</b> - 96 φρεάτια σε μικρο-πλάκα από πολυστυρένιο (12 λωρίδες από 8 φρεάτια) επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα επίμυος. Κωδικός 890218 - 1 πλάκα
<b>VEGF Συζευκτής</b> - 21 mL/φιαλίδιο πολυκλωνικού αντισώματος ενάντια στον VEGF συζευγμένο με υπεροξειδάση από το φυτό <i>armoracia lapathipholia</i> (ραπανάκι) με συντηρητικό. Κωδικός 890219 - 1 φιαλίδιο
<b>VEGF Δείγμα Ελέγχου</b> - 2000 pg/φιαλίδιο ανασυνδυασμένου VEGF165 σε ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικό λυόφιλωμένο. Κωδικός 890220 - 3 φιαλίδια
<b>Διαλύτης Δειγμάτων RD1W</b> - 11 mL/φιαλίδιο βασικό ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης με συντηρητικό. Κωδικός 895117 - 1 φιαλίδιο
<b>Διαλύτης Βαθμονόμησης RD6U</b> - 21 mL/φιαλίδιο από ζωικό ορό με συντηρητικά. Για δείγματα μέτρησης ορού/πλάσματος. Κωδικός - 895148 1 φιαλίδιο
<b>Συμπυκνωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα</b> - 21 mL/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives. Κωδικός 895003 - 1 φιαλίδιο
<b>Αντιδραστήριο Χρώματος A</b> - 12.5 mL/φιαλίδιο σταθεροποιημένου υπεροξειδίου του υδρογόνου. Κωδικός 895000 - 1 φιαλίδιο
<b>Αντιδραστήριο Χρώματος B</b> - 12.5 mL/φιαλίδιο σταθεροποιημένου χρωμογόνου (τετραμέθυλοβενζιδίνη). Κωδικός 895001 1 φιαλίδιο
<b>Καλύμματα Πλάκας</b> - Λωρίδες επικάλυψης. 4 λωρίδες

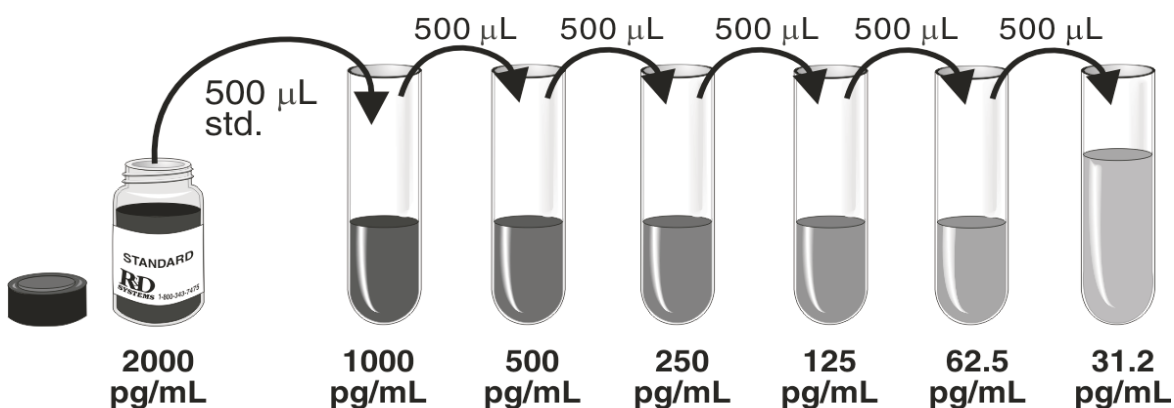
#### Πίνακας 1.

Απαραίτητα υλικά για τη μέτρηση των επιπέδων του VEGF.

Για μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm, με τη διόρθωση μήκος κύματος να καθορίζεται στα 540 nm, χρησιμοποιήθηκε συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας Labsystems Multiskan και Reader Genesis – software. Όλα τα αντιδραστήρια έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου, πριν από τη χρήση. Εάν έχουν σχηματιστεί κρύσταλλοι στο συμπύκνωμα, τότε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναμειγνύεται απαλά, έως ότου οι κρύσταλλοι να διαλυθούν τελείως. Τα 20 ml του πυκνού διαλύματος πλύσης αραιώνονται σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό, για την παρασκευή 500 mL του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.

Για το διάλυμα υποστρώματος, τα αντιδραστήρια χρώματος A και B θα πρέπει να αναμειγνύονται μαζί, σε ίσους όγκους εντός 15 λεπτών, από τη χρήση. Πρέπει να προστατεύονται από το φως. Ακριβώς 200  $\mu\text{L}$  του προκύπτοντος μίγματος απαιτούνται ανά φρεάτιο.

Για το VEGF πρότυπο δείγμα, γίνεται ανασύσταση με 1.0 mL του αραιωτικού βαθμονόμησης RD6U, σε δείγματα ορού. Για να δημιουργηθεί η βαθμονόμηση του προτύπου VEGF στις συγκεντρώσεις, χρειάζεται να γίνουν αραιώσεις, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7. Χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες πολυπροπυλενίου, που σε κάθε ένα προστέθηκαν 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος βαθμονόμησης RD6U. Μετέπειτα, από το ανασυσταθέν πρότυπο δείγμα VEGF, έγινε λήψη 500  $\mu\text{L}$  και μετά από καλή ανάμειξη με 500  $\mu\text{L}$  του αραιωτικού, μεταφέρεται στο επόμενο σωληνάριο. Ως αραιωτικό κάθε σωληναρίου, χρησιμοποιείται το διάλυμα αποθέματος που παράγει μια σειρά αραιώσης (παρακάτω). Το μη αραιωμένο πρότυπο χρησιμεύει ως το υψηλό πρότυπο (2000  $\text{pg}/\text{mL}$ ). Το διάλυμα RD6U που χρησιμοποιείται ως αραιωτικό, χρησιμεύει ως το πρότυπο μηδέν (0  $\text{pg}/\text{mL}$ ).



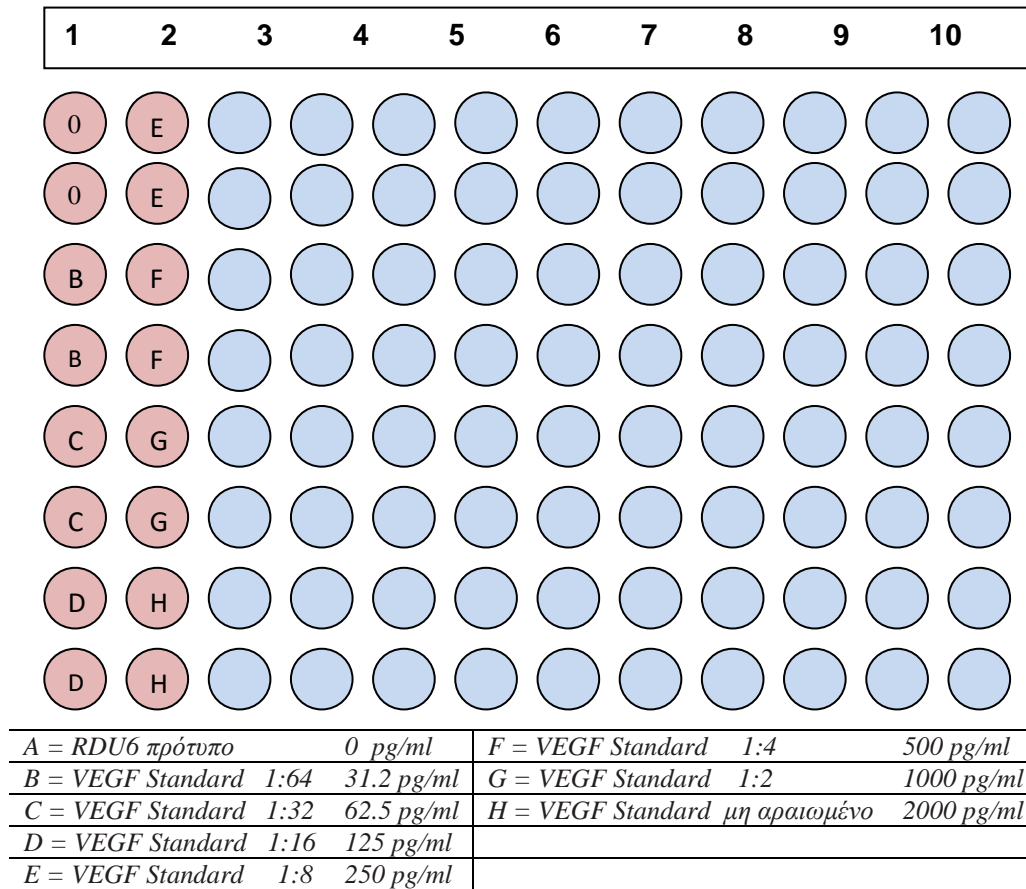
**Σχήμα 7.**

Αραιωτικό RD6U σε κάθε σωληνάριο. Χρησιμοποιείται το διάλυμα αποθέματος, ώστε να παράγει μια σειρά αραιώσης. Το μη αραιωμένο πρότυπο χρησιμεύει ως το υψηλό πρότυπο (2.000  $\text{pg}/\text{mL}$ ), αραιωτικό RD6U χρησιμεύει ως πρότυπο μηδέν (0  $\text{pg}/\text{mL}$ ).

Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα αφέθηκαν να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη μέτρηση. Όλα τα δείγματα ασθενών και τα πρότυπα δείγματα προσδιορίστηκαν εις διπλούν.

Το Σχήμα 8 αναδεικνύει πως τοποθετούνται τα πρότυπα δείγματα και τα δείγματα ασθενών, καθένα μετρημένο εις διπλούν:

- Προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  του RD1W διαλύτη ανάλυσης σε κάθε φρεάτιο
- Προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  του προτύπου δείγματος VEGF στις αραιώσεις που έχουν ήδη γίνει, χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα για την τιμή 0  $\text{pg/mL}$ , και τα δείγματα ασθενών εις διπλούν, ανά φρεάτιο. Τοποθετείται κάλυμμα με αυτοκόλλητη ταινία πάνω σε κάθε πλάκα και αφήνεται για επώαση 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Χρησιμοποιούνται 400  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε κάθε φρεάτιο και έκπλυση, επαναλαμβάνοντας αυτή την διαδικασία δύο φορές για ένα σύνολο τριών πλύσεων. Η πλήρης απομάκρυνση του υγρού σε κάθε βήμα είναι απαραίτητη για την καλή απόδοση. Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρείται τυχόν υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αναποδογυρίζοντας την μικροπλάκα και στεγνώνοντάς την επάνω σε καθαρό χαρτί κουζίνας.
- Στα φρεάτια προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  του μορίου σύζευξης του VEGF. Η πλάκα καλύπτεται με μια νέα αυτοκόλλητη ταινία και αφήνεται να επωαστεί επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
- Μετά το πέρας των 2 ωρών επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλύσης όπως στο βήμα 3
- Στην πλάκα που έχει ξεπλυθεί προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  του διαλύματος υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι. Σε αυτό το βήμα, η πλάκα πρέπει να προστατευτεί από το φως, αφήνοντάς την σε σκοτεινό χώρο, ώστε να επωαστεί για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτή τη χρονική διάρκεια στα φρεάτια θα σχηματιστεί μια απόχρωση του χρώματος μπλε/πράσινο, ανάλογα της συγκέντρωσης του VEGF
- Μετά το πέρας των 25 λεπτών προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος παύσης. Το χρώμα αλλάζει από μπλε/πράσινο σε κίτρινο, που εάν δεν εμφανίζεται ενιαία, χρειάζεται ήπιο χτύπημα στην πλάκα για να εξασφαλιστεί πλήρης ανάμειξη.
- Με τη χρήση φωτομετρικής συσκευής, προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα κάθε φρεατίου εντός 30 λεπτών, με τον αναγνώστη μικροπλακών ρυθμισμένο στα 450 nm. Εάν διατίθεται διόρθωση μήκους κύματος, αυτή είναι στα 540 nm ή 570 nm. Αυτή η αφαίρεση θα διορθώσει τις οπτικές ατέλειες στην πλάκα. Οι αναγνώσεις που γίνονται απευθείας στα 450 nm χωρίς διόρθωση, μπορεί να είναι υψηλότερες και λιγότερο ακριβείς



### **Σχήμα 8.**

Χάρτης σχεδιασμού μικροπλάκας, κατά την εξέταση των δειγμάτων του VEGF, με μέθοδο ELISA της Quantikine®.

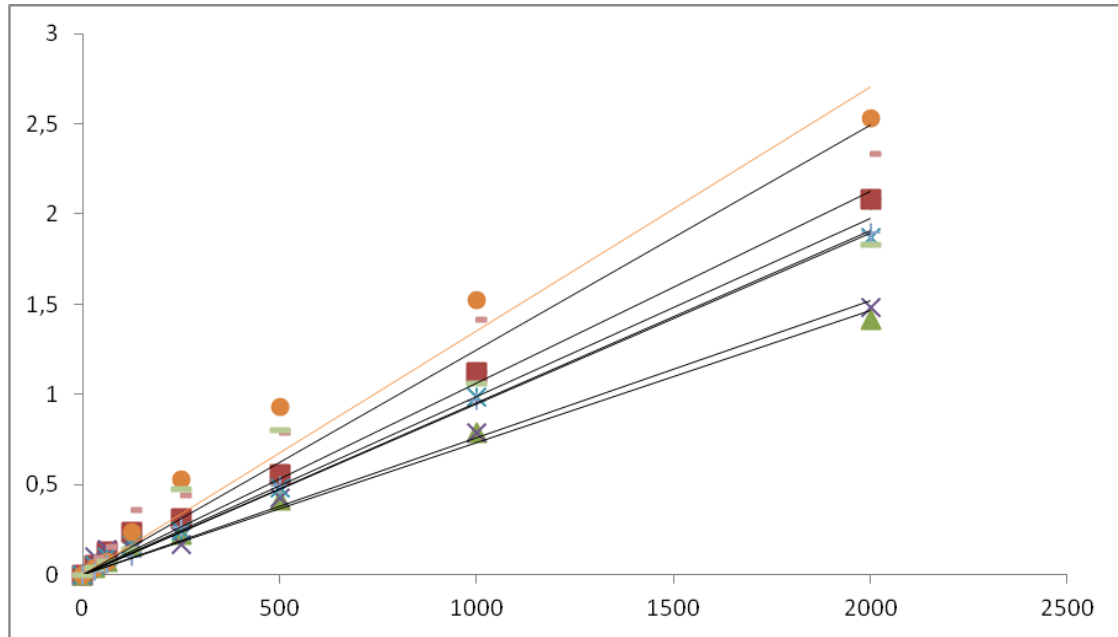
Για τη δημιουργία των δειγμάτων έλεγχου χρησιμοποιήθηκε το υπερσυμπυκνωμένο δείγμα H, το οποίο αραιώθηκε κατά σειρά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, ελήφθη ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων, για κάθε πρότυπο δείγμα, και δείγματα ασθενών. Από κάθε τιμή που προέκυπτε, αφαιρούσαμε τον μέσο όρο της τιμής του προτύπου δείγματος με συγκέντρωση 0 pg/mL. Με βάση τις τιμές των προτύπων δειγμάτων και τις αραιώσεις που έχουν γίνει στο πυκνό διάλυμα VEGF, δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη όπου οι συντεταγμένες θα έχουν τη μορφή: γ-άξονας: μέση απορρόφηση για κάθε πρότυπο δείγμα, χ-άξονας: συγκέντρωση των προτύπων δειγμάτων. Έπειτα δημιουργήθηκε μια καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Excel (Microsoft Windows), για γραμμική σχέση ανάμεσα στα σημεία. Εάν τα δείγματα είχαν αραιωθεί, η συγκέντρωση διαβάζονταν από την πρότυπη καμπύλη και έπρεπε να πολλαπλασιαστεί με το συντελεστή αραιώσης, για τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης. Στην μελέτη μας δεν χρειάστηκε καμία αραιώση σε κανένα δείγμα.

Η μέτρηση του VEGF με την μέθοδο ELISA βασίζεται σε μια πρότυπη βαθμονομημένη καμπύλη, που παράγεται από τα οκτώ σημεία των πρότυπων δειγμάτων, όπως φαίνονται στο Σχήμα 8. Η πρότυπη βαθμονομημένη καμπύλη δημιουργείται από την απορρόφηση στα 450nm, αφού έχει γίνει διόρθωση για το πρότυπο δείγμα (0 pg/ml), σε αντιπαράθεση με τη γνωστή συγκέντρωση του VEGF σε pg/ml. Η αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων της πρότυπης καμπύλης, εκτιμήθηκε από τη μέτρηση των οκτώ προτύπων δειγμάτων εις διπλούν σε κάθε μικροπλάκα στα πρώτα 16 φρεάτια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.

Τα δείγματα ελέγχου που παρέχονταν από τον κατασκευαστή χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των καμπυλών ελέγχου. Με αυτόν τον τρόπο, καθορίστηκε εάν τα δείγματα που εξετάστηκαν είχαν αποδεκτές τιμές. Το κριτήριο αποδοχής ήταν, ότι τα δείγματα ελέγχου που μετρήθηκαν, έπρεπε να βρίσκονται εντός των ορίων που αναφέρονται από τον κατασκευαστή, για κάθε μια από τις μετρήσεις. Εάν οι τιμές ήταν εκτός των ορίων η μέτρηση αυτή δεν θα συμπεριλαμβανόταν στην εκτίμηση και θα επαναλαμβανόταν είτε με νέο δείγμα (για πολύ χαμηλή τιμή), ή με αραιώση του αρχικού δείγματος (για πολύ υψηλή τιμή).

Για την εκτίμηση των καμπυλών ελέγχου σε κάθε kit του VEGF, το δείγμα της υψηλότερης συγκέντρωσης των 2.000 ng/ml αραιώθηκε κατά σειρά, όπως αναδεικνύεται στο Σχήμα 7. Υπήρχαν συνολικά 8 δείγματα ελέγχου στις διάφορες συγκεντρώσεις, για την αξιολόγηση των δειγμάτων. Τα δείγματα ελέγχου μετρήθηκαν εις διπλούν και τοποθετηθήκαν στα φρεάτια όπως αναδεικνύεται στο Σχήμα 8. Το δείγμα ελέγχου όπως αναφέρθηκε ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα RDU6, που παρέχεται για τις αραιώσεις του πυκνού δείγματος ελέγχου. Στο τέλος της διαδικασίας των μετρήσεων, το πρόγραμμα ανάλυσης του μηχανήματος ανάγνωσης, παρείχε τις τιμές της απορρόφησης. Μέσω των τιμών αυτών και γνωρίζοντας τη συγκέντρωση κάθε δείγματος ελέγχου, μια καμπύλη δημιουργήθηκε, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Excel. Στην καμπύλη που δημιουργήθηκε, προστέθηκε γραμμή τάσης γραμμικής συνάρτησης, με ορισμό τη μηδενική απορρόφηση για το δείγμα ελέγχου με συγκέντρωση VEGF = 0 ng/ml. Από τη συνάρτηση που δίνεται από το λογισμικό του τύπου  $y = a x + \beta$ , ήταν δυνατόν να εκτιμηθεί η συγκέντρωση στο κάθε δείγμα, κατά την μέτρηση από το απορροφησιόμετρο, γνωρίζοντας για το καθένα την απορρόφηση στα 450nm (διόρθωση στα 540 nm).



**Σχήμα 9.**

Αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων των καμπυλών αναφοράς, για κάθε μια από τις μικροπλάκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του VEGF. Όλες οι καμπύλες είναι σε γραμμική μορφή.

Η στατιστική ανάλυση με μέθοδο μεικτού σχεδιασμού ANOVA, για τις μετρήσεις των καμπυλών ελέγχου των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των δειγμάτων που δημιουργήθηκαν για την πρότυπη καμπύλη, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p > 0.05$ ), ανάμεσα στις τιμές των καμπυλών, για κάθε αραιώση των δειγμάτων ελέγχου.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του VEGF, που παρήχθησαν ως απορρόφηση στο φωτομετρικό αναλυτή Labsystem Multiskan, εκτυπώθηκαν από το σύστημα της Labsystems Multiskan MS reader - Genesis software και ύστερα μεταφέρθηκαν στο λογισμικό Excel για αποθήκευση και ανάλυση. Όπως αναφέρθηκε στο βήμα 8 της διαδικασίας μέτρησης, ο αναγνώστης των μικροπλακών (φρεατίων) είναι ρυθμισμένος στα 450 nm. Η διόρθωση του μήκους κύματος γίνονταν στα 540 nm ή στα 570 nm. Αυτή η αφαίρεση διόρθωνε τις όποιες οπτικές ατέλειες στην πλάκα και έδινε μεγαλύτερη ακρίβεια στις τιμές των δειγμάτων.

## 2.4 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS v21 (SPSS, Inc, Chicago, Ill). Για τη σύγκριση των επιπέδων του VEGF, της πρωτεΐνης C, της AT III και του παράγοντα VIII, τόσο για κάθε ομάδα ξεχωριστά, όσο και για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων εντός κάθε ομάδας, χρησιμοποιήθηκαν οι επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε σχεδιασμό μικτής ANOVA. Για τις επιμέρους συγκρίσεις των αποτελεσμάτων ανά χρονική στιγμή λήψης του δείγματος (0, 10<sup>η</sup> και 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα) έγινε χρήση του ίδιου

στατιστικού πακέτου. Για post-hoc συγκρίσεις ανάμεσα στις ομάδες μελέτης και τυχόν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα τους, χρησιμοποιήθηκε το Tukey test. Σε όλες τις μετρήσεις ελήφθη ως παραδοχή, ότι οι τιμές του VEGF και των πρωτεϊνών πήξης που μελετήθηκαν, δεν διέφεραν σημαντικά, έτσι ώστε τυχόν σημαντικές διαφορές να εξεταστούν αναλυτικά, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές γίνονταν αποδεκτές σε τιμές του  $p < 0.05$ .



## 2.5 Αποτελέσματα

### 2.5.1 Ασθενείς της μελέτης

Τελικά, στην ανάλυση των αποτελεσμάτων συμπεριλήφθηκαν συνολικά 59 ασθενείς. 11 στην ομάδα I, 15 στην ομάδα II, 13 στην ομάδα III και 15 στην ομάδα IV.

Κατά την πορεία ανάλυσης των αποτελεσμάτων της μελέτης και μετά τις μετρήσεις των επιπέδων του VEGF, διαπιστώθηκε πως 5 συγκεκριμένοι ασθενείς, εμφάνιζαν δυσανάλογα μεγάλη αύξηση των τιμών κατά τη 10<sup>η</sup> και την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους ασθενείς. Διαπιστώθηκε πως και οι 5 αυτοί ασθενείς και μόνο αυτοί, είχαν ιστολογική διάγνωση βλεννώδους αδενοκαρκινώματος. Η υπέρμετρη αυτή αύξηση των τιμών του VEGF και ο ειδικός ιστολογικός τύπος, μας οδήγησαν στην απόφαση της εξαίρεσης των ασθενών αυτών, από την ομάδα όπου είχαν αρχικά ενταχθεί και στην συμπερίληψή τους σε μια νέα ομάδα μελέτης, την ομάδα MUC: mucinous adenocarcinoma.

### 2.5.2 Επιδημιολογικά και άλλα χαρακτηριστικά

Τα επιδημιολογικά και άλλα χαρακτηριστικά των ασθενών, όλων των ομάδων, φαίνονται στον Πίνακα 2. Όλοι οι ασθενείς ανήκαν στη λευκή φυλή και κανένας δεν ελάμβανε αντιπηκτική αγωγή, που θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα των πρωτεϊνών πήξης και του VEGF. Στους ασθενείς οι οποίοι εισέρχονταν στην μελέτη, γίνονταν λήψη ατομικού και κληρονομικού ιστορικού, καταγραφή των διαιτητικών τους συνηθειών, έτσι ώστε να εκτιμηθούν παράγοντες που θα μπορούσαν να έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νεοπλασματικής νόσου. Κατά την εισαγωγή για τον προεγχειρητικό έλεγχο γίνονταν μέτρηση του ύψους και του βάρους. Η κατανάλωση αλκοόλ μετρήθηκε σε μονάδες/μέρα (U/μέρα), με 1 μονάδα να είναι ισότιμη με 10 mL αιθυλικής αλκοόλης. Η κατανάλωση καφεΐνης μετρήθηκε με βάση την υπόθεση, ότι ο μέσος όρος μια κούπας τσαγιού ή ένα φλιτζάνι καφέ περιέχουν περίπου 100 mg καφεΐνης.

Τα αποτελέσματα από τις πληροφορίες που συλλέχθηκαν από το ιστορικό των ασθενών, αναλύθηκαν για διαφορές και στατιστική σημαντικότητα, με τη χρήση της παραμετρικής ανάλυσης των διακυμάνσεων μίας κατεύθυνσης (one way ANOVA), με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί μια τροποποίηση που έλαβε χώρα κατά την ανάλυση των δεδομένων. Από τους ασθενείς που αρχικά αποτέλεσαν την ομάδα I, παρατηρήθηκε ότι περίπου το 1/3 αυτών, είχε πολύ αυξημένα επίπεδα VEGF, κατά τη 10<sup>η</sup> και 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, που διέφερε σημαντικότερα, σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους ασθενείς, όλων των ομάδων. Από την ανάλυση των ιστολογικών πορισμάτων, αναδείχθηκε ότι οι ασθενείς αυτοί ήταν οι μόνοι, που εμφάνιζαν αδενοκαρκινώματα βλεννώδους τύπου (>50% παρουσία βλέννης). Όπως είναι γνωστό

από τη βιβλιογραφία, ο ιστολογικός αυτός τύπος αντιπροσωπεύει το 10-15% των νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου και έχει πιθανότατα δυσμενέστερη πρόγνωση, εμφανίζεται δε ανθεκτικός στη χημειοθεραπεία. Έτσι, αποφασίσθηκε, τα αποτελέσματα των ασθενών αυτών να εξετασθούν ανεξάρτητα των άλλων ομάδων, αποτελώντας την συμπληρωματική ομάδα MUC. Οι ασθενείς αυτοί είχαν λάβει θρομβοπροφύλαξη με 3.500 IU τινζαπαρίνης για 10 ημέρες, γιατί κατ' αρχήν ανήκαν όλοι στην ομάδα I.

ΟΜΑΔΕΣ	I	II	III	IV	MUC	P
<b>Ηλικία*</b>	65 ± 8	62 ± 10	63 ± 11	64 ± 10	68 ± 5	
<b>Φύλο</b>						
Άρρεν	6	7	6	7	2	-
Θήλυ	5	8	7	8	3	-
<b>ΔΜΣ</b>	29±5	31±4	29±6	30±3	32±6	-
<b>Ηχ υπερτασικής νόσου</b>						
Ναι	3 (28)	4(27)	4(31)	4 (27)	2(40)	-
Όχι	8(72)	11(73)	9(69)	11(73)	3(60)	-
<b>Κάπνισμα</b>						
Ποτέ	5(46)	6(40)	5(38)	7(46)	2 (40)	-
Πρώην	2(18)	2(13)	2(16)	3(20)	2 (40)	-
Νυν	4(36)	7(47)	6(46)	5(34)	1 (20)	-
<b>Επίπεδο άσκησης</b>						
Σπάνια	3(27)	4(27)	3(23)	2(13)	1 (20)	-
Περιστασιακά	6(54)	8(53)	7(54)	10(65)	3 (60)	-
Συστηματικά	2(19)	3(20)	3(23)	3(22)	1 (20)	-
<b>Αλκοόλ (U/μέρα)</b>	1.3 ± 2.3	0.7 ± 0.8	1.8 ± 2.2	1.4 ± 1.6	0.8 ± 1.2	-
<b>Καφεΐνη*(mg/μέρα)</b>	316 ± 76	172 ± 147	250 ± 111	278 ± 81	200 ± 57	-
<b>Ασβέστιο (mg/μέρα)</b>	100 ± 173	514 ± 366	236 ± 118	339 ± 295	189 ± 95	-
<b>Σκευάσματα διατροφής</b>						
Ναι	3(27)	2(13)	2(15)	3(20)	1 (20)	-
Όχι	8(73)	13(87)	11(85)	12(80)	4(80)	-
<b>Συμπτώματα από ΓΕΣ</b>						
Αίμα στα κόπρανα	4(36)	3(20)	2(15)	3(20)	0(0)	-
Άτυπο κοιλιακό άλγος	3(28)	6(40)	5(38)	5(33)	3(60)	-
Διάρροια/δυσκοιλιότητα	4(36)	4(27)	6(47)	5(33)	2(40)	-
Σύν. ευερέθιστου εντέρου	-	2(13)	-	2(14)		-

### Πίνακας 2.

Επιδημιολογικοί και άλλοι παράγοντες,  
που πιθανά συσχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

\* τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέση τιμή και η σταθερή απόκλισή της (mean ± SD).

Με βάση την πολυπαραγοντική ανάλυση, δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών, ανάμεσα στις ομάδες μελέτης.

### 2.4.3 Αιματολογικό και βιοχημικό προφίλ

Από τους ασθενείς που έλαβαν μέρος στην μελέτη, έγιναν αιμοληψίες για τη συλλογή ολικού αίματος, ορού και πλάσματος. Όπως αναφέρθηκε, οι δειγματοληψίες έγιναν κατά την ημέρα προ του χειρουργείου (pre-op day), τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική (10<sup>th</sup> post-op day) και την 30<sup>η</sup> (30<sup>th</sup> post-op day) μετεγχειρητική ημέρα. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η ίδια στατιστική ανάλυση των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, με σχεδιασμό μεικτής ανάλυσης ANOVA, με στατιστικά σημαντική τιμή να σημαίνει  $p < 0.05$ . Ο Πίνακας 3 δείχνει τις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων, βάσει της γενικής αίματος, για κάθε ομάδα μελέτης, ενώ ο Πίνακας 4 τις μεταβολές των βιοχημικών παραμέτρων που εξετάστηκαν, για τις ανάλογες χρονικές στιγμές.

ΟΜΑΔΑ	I	II	III	IV	MUC	P
<b>ΕΞΕΤΑΣΗ</b>						
<b>WBC</b>						
pre-op	8.98	8.94	6.54	10.43	6.45	-
10 <sup>th</sup> post-op	9.23	8.02	7.58	8.45	7.39	-
30 <sup>th</sup> post-op	7.76	9.01	7.87	7.45	9.08	-
<b>Αιματοκρίτης</b>						
pre-op	38	39	39	40	39	-
10 <sup>th</sup> post-op	37	38	37	37	38	-
30 <sup>th</sup> post-op	39	39	37	38	40	-
<b>Αιμοσφαιρίνη</b>						
pre-op	13	13	13	14	13	-
10 <sup>th</sup> post-op	12	13	13	13	13	-
30 <sup>th</sup> post-op	13	13	12	13	13	-
<b>Αιμοπετάλια</b>						
pre-op	340	290	330	320	300	-
10 <sup>th</sup> post-op	310	340	340	350	280	-
30 <sup>th</sup> post-op	305	285	290	340	320	-
<b>PT</b>						
pre-op	13	12	13	12	12	-
10 <sup>th</sup> post-op	12	12	12	12	13	-
30 <sup>th</sup> post-op	13	13	13	12	12	-
<b>aPTT</b>						
pre-op	28	26	28	27	26	-
10 <sup>th</sup> post-op	25	24	27	26	27	-
30 <sup>th</sup> post-op	27	26	27	28	26	-
<b>Ινωδογόνο</b>						
pre-op	540	624	496	507	670	-
10 <sup>th</sup> post-op	816	956	875	984	1067	-
30 <sup>th</sup> post-op	414	512	453	443	587	-

**Πίνακας 3.**

**Αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων και εξετάσεων πήξης.**

*Tibc*: Total iron binding capacity, *PT*: Protrombin time, *aPTT*: activated Partial Thromboplastin Time.

ΟΜΑΔΑ	I	II	III	IV	MUC	P
<b>ΕΞΕΤΑΣΗ</b>						
<b>Κρεατινίνη</b>						
pre-op day	0.8	0.7	0.9	0.8	0.9	-
10 <sup>th</sup> post-op day	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	-
30 <sup>th</sup> post-op day	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9	-
<b>AST</b>						
pre-op day	34	29	34	28	27	-
10 <sup>th</sup> post-op day	28	36	17	27	21	-
30 <sup>th</sup> post-op day	27	31	23	23	25	-
<b>ALT</b>						
pre-op day	23	18	22	25	19	-
10 <sup>th</sup> post-op day	27	21	26	27	24	-
30 <sup>th</sup> post-op day	25	16	25	31	27	-
<b>ALP</b>						
pre-op day	87	60	98	85	97	-
10 <sup>th</sup> post-op day	79	73	96	84	82	-
30 <sup>th</sup> post-op day	90	81	92	79	81	-
<b>γGT</b>						
pre-op day	34	23	39	28	26	-
10 <sup>th</sup> post-op day	24	28	26	23	25	-
30 <sup>th</sup> post-op day	31	32	35	29	29	-
<b>LDH</b>						
pre-op day	240	196	167	147	183	-
10 <sup>th</sup> post-op day	278	265	187	159	204	-
30 <sup>th</sup> post-op day	197	212	205	187	176	-
<b>TBL</b>						
pre-op day	0.9	0.7	0.6	0.7	0.6	-
10 <sup>th</sup> post-op day	1.0	0.9	0.8	0.7	0.7	-
30 <sup>th</sup> post-op day	0.8	0.6	0.7	0.8	0.7	-
<b>Alb</b>						
pre-op day	2.9	3.1	3.0	3.1	2.8	-
10 <sup>th</sup> post-op day	2.7	3.1	3.0	3.0	2.9	-
30 <sup>th</sup> post-op day	3.2	3.2	3.2	3.1	3.0	-
<b>Σίδηρος</b>						
pre-op	31	41	39	34	45	-
10 <sup>th</sup> post-op	22	15	25	17	23	-
30 <sup>th</sup> post-op	25	47	33	31	45	-
<b>Φερριτίνη</b>						
pre-op	32	28	43	39	52	-
10 <sup>th</sup> post-op	12	16	22	18	23	-
30 <sup>th</sup> post-op	21	17	29	32	24	-
<b>Tibc</b>						
pre-op	412	398	432	217	387	-
10 <sup>th</sup> post-op	754	635	812	698	795	-
30 <sup>th</sup> post-op	532	514	453			

#### **Πίνακας 4.**

**Αποτελέσματα βιοχημικών εξετάσεων.**

ALP: alkaline phosphatase, AST: aspartate transaminase, Ca<sup>+2</sup>: ασβέστιο,  
TBL: Ολική χολερυθρίνη, Alb: Αλβουμίνη, γGT: γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση.

Από τη στατιστική ανάλυση των αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων, καθώς και των παραμέτρων πηκτικού ελέγχου, με τη μέθοδο των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων με μεικτή ανάλυση ANOVA, δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες μελέτης ( $p > 0.05$ ) (Πίνακες 3 και 4).

#### 2.4.4 Αποτελέσματα της ανάλυσης των επιπέδων VEGF στις ομάδες μελέτης

Στον Πίνακα 5 αναγράφονται οι μέσες τιμές ( $\pm$ SD) του VEGF-A 165 (που πλέον για λόγους συντομίας θα αναφέρεται ως VEGF), για την κάθε ομάδα και για κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Γραφικά αυτές απεικονίζονται στο Σχήμα 10.

Η περαιτέρω ανάλυση των τιμών των επιπέδων του VEGF, προς διερεύνηση πιθανών μεταβολών τους στις διάφορες μετεγχειρητικές στιγμές και εντός της κάθε ομάδας, εμφανίζεται στον Πίνακα 6.

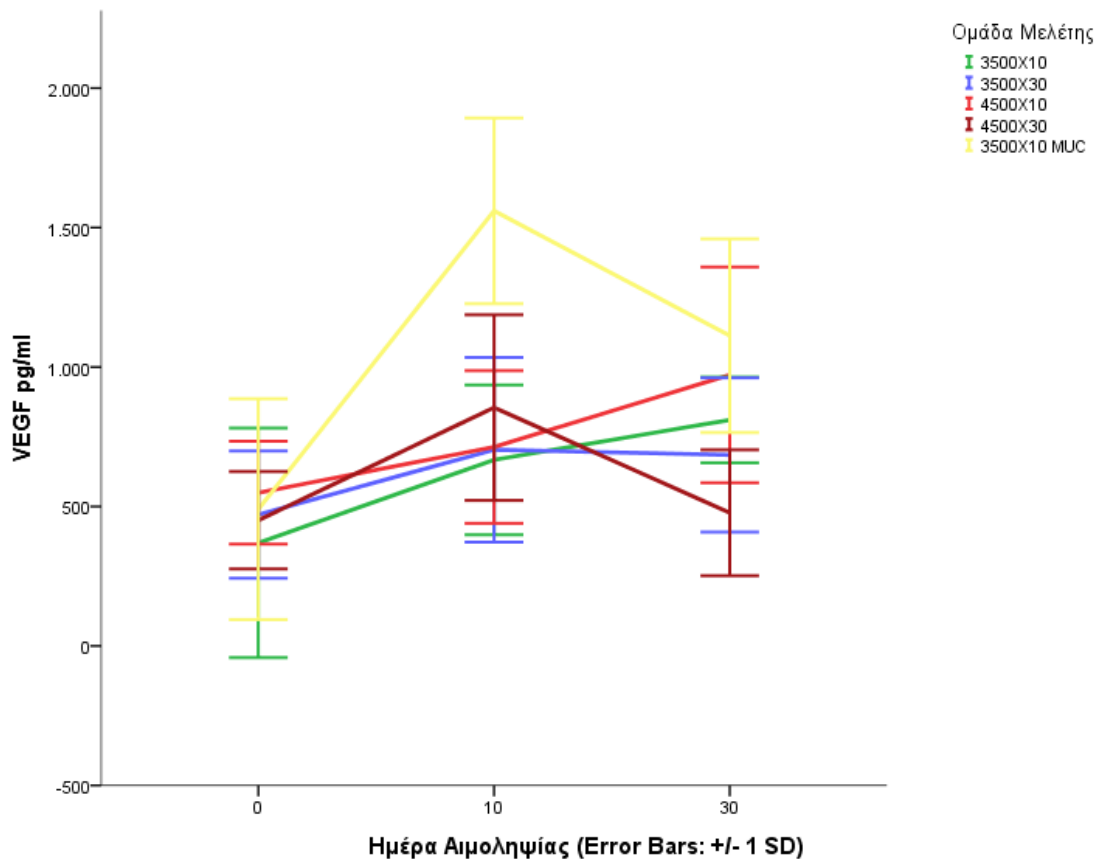
Στον Πίνακα 7 αναδεικνύεται η σύγκριση των μέσων τιμών των επιπέδων του VEGF, μεταξύ των διαφόρων ομάδων, στις διάφορες χρονικές στιγμές και αποδίδεται το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς των τιμών.

Στον Πίνακα 8 αναγράφονται οι μέσες τιμές ( $\pm$ SD) του VEGF, για τους ασθενείς που έλαβαν θρομβοπροφύλαξη βραχείας διάρκειας (10 ημέρες, ομάδες I και III) και για αυτούς που έλαβαν θρομβοπροφύλαξη μακράς διάρκειας (30 ημέρες, ομάδες II και IV). Η σχετική απεικόνιση γίνεται στο Σχήμα 11.

ΟΜΑΔΕΣ	I	II	III	IV	MUC
<b>pre-op</b>	369 $\pm$ 411	471 $\pm$ 228	549 $\pm$ 184	450 $\pm$ 174	490 $\pm$ 396
<b>10<sup>th</sup> post-op</b>	667 $\pm$ 268	703 $\pm$ 331	713 $\pm$ 274	854 $\pm$ 332	1560 $\pm$ 333
<b>30<sup>th</sup> post-op</b>	810 $\pm$ 153	685 $\pm$ 276	971 $\pm$ 387	477 $\pm$ 226	1112 $\pm$ 348

#### Πίνακας 5.

Μέσες τιμές ( $\pm$ SD) επιπέδων VEGF, για κάθε ομάδα, στις διάφορες χρονικές στιγμές (σε pg/mL).



### Σχήμα 10.

Επίπεδα του VEGF, ανά ομάδα μελέτης, στις διάφορες χρονικές στιγμές.

Οι μέσες τιμές των προεγχειρητικών επιπέδων (pre-op) του VEGF, σε οποιαδήποτε από τις ομάδες, δεν διέφεραν από τα αντίστοιχα κάθε άλλης ομάδας. Σε όλες τις ομάδες, κατά τη 10η μετεγχειρητική ημέρα, παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών του VEGF, σε σύγκριση με αυτές που μετρήθηκαν προεγχειρητικά. Η αύξηση αυτή είχε στατιστικά σημαντικό χαρακτήρα ( $p < 0.05$ ) για όλες τις ομάδες, πλην της ομάδος III ( $p = 0.190$ ).

Από την περαιτέρω, όμως, ανάλυση των δεδομένων, προκύπτουν πολλές συγκρίσεις με στατιστική σημαντικότητα:

**Στην ομάδα I** (3.500 IU of LMWH x 10 ημέρες), η διαφορά της μέσης τιμής των προεγχειρητικών επιπέδων (pre-op) του VEGF, σε σχέση με την αυξηθείσα τιμή τους κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day), αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική ( $p = 0.008$ ). Στην 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (30<sup>th</sup> post-op day) οι τιμές του VEGF, αυξήθηκαν έτι περαιτέρω και εξακολούθησαν να είναι στατιστικά υψηλότερες, από ότι προεγχειρητικά ( $p = 0.000$ ).

**Στην ομάδα II** (3.500 IU of LMWH x 30 ημέρες), η διαφορά της μέσης τιμής των προεγχειρητικών επιπέδων (pre-op) του VEGF, σε σχέση με την αυξηθείσα τιμή τους κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day), αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική ( $p = 0.017$ ). Στην 30<sup>η</sup>

μετεγχειρητική ημέρα (30<sup>th</sup> post-op day) οι τιμές του VEGF, αντίθετα από την ομάδα I, μειώθηκαν έστω και ελαφρά σε σχέση με την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day), και ήταν στατιστικά υψηλότερες, από ότι προεγχειρητικά ( $p = 0.041$ ).

ΟΜΑΔΑ	ΔΕΙΓΜΑ Α	ΔΕΙΓΜΑ Β	ΔΜΤ	P
<b>I</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	-297	<b>0,008</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-440	<b>0,000</b>
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	297	<b>0,008</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-143	0,301
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	440	<b>0,000</b>
		10 <sup>th</sup> post-op day	143	0,301
<b>II</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	-232	<b>0,017</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-214	0,041
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	232	<b>0,017</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	18	1,000
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	214	<b>0,041</b>
		10 <sup>th</sup> post-op day	-18	1,000
<b>III</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	-164	0,190
		30 <sup>th</sup> post-op day	-422	<b>0,000</b>
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	164	0,190
		30 <sup>th</sup> post-op day	-258	<b>0,005</b>
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	422	<b>0,000</b>
		10 <sup>th</sup> post-op day	258	<b>0,005</b>
<b>IV</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	-404	<b>0,000</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-27	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	404	<b>0,000</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	377	<b>0,000</b>
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	27	1,000
		10 <sup>th</sup> post-op day	-377	<b>0,000</b>
<b>MUC</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	-1070	<b>0,000</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-622	<b>0,000</b>
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	1070	<b>0,000</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	448	<b>0,003</b>
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	622	<b>0,000</b>
		10 <sup>th</sup> post-op day	-448	<b>0,003</b>

### **Πίνακας 6.**

Συγκριτική μελέτη μέσων τιμών επιπέδων του VEGF, στις διάφορες χρονικές στιγμές και εντός κάθε ομάδας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΟΜΑΔΑ Α	ΟΜΑΔΑ Β	ΜΔΤ	P	ΔΕΙΓΜΑ	ΟΜΑΔΑ Α	ΟΜΑΔΑ Β	ΜΔΤ	P
10 <sup>th</sup> post-op day	I	II	-36.1	1,000	30 <sup>th</sup> post-op day	I	II	125	1,000
		III	-46.2	1,000			III	-161	1,000
		IV	-187.5	1,000			IV	333	<b>0,044</b>
		MUC	-892.9	<b>0,000</b>			MUC	-302	0,521
		II	I	36.1			1,000	II	I
II	I	III	-10.1	1,000	II	I	III	-287	<b>0,097</b>
		IV	-151.4	1,000			IV	207	0,489
		MUC	-856.8	<b>0,000</b>			MUC	-427	<b>0,049</b>
		III	I	46.2			1,000	III	I
III	I	II	10.1	1,000	III	I	II	287	0,097
		IV	-141.3	1,000			IV	494	<b>0,000</b>
		MUC	-846.7	<b>0,000</b>			MUC	-141	1,000
		IV	I	187.5			1,000	IV	I
IV	I	II	151.4	1,000	IV	I	II	-207	0,489
		III	141.3	1,000			III	-494	<b>0,000</b>
		MUC	-705.4	<b>0,000</b>			MUC	-635	<b>0,001</b>
		MUC	I	892.9			<b>0,000</b>	MUC	I
MUC	I	II	856.8	<b>0,000</b>	MUC	I	II	427	<b>0,049</b>
		III	846.7	<b>0,000</b>			III	141	1,000
		IV	705.4	<b>0,000</b>			IV	635	<b>0,001</b>

### Πίνακας 7.

Συγκριτική μελέτη μέσω των τιμών των επιπέδων του VEGF μεταξύ των ομάδων, στις διάφορες χρονικές στιγμές.

ΜΔΤ: Μέση Διαφορά Τιμών.



**Στην ομάδα III** (4.500 IU of LMWH x 10 ημέρες), όπως και στις προηγούμενες δύο ομάδες, η μέση τιμή των επιπέδων του VEGF κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day) αυξήθηκε σε σχέση με τα προεγχειρητικά επίπεδα (pre-op), χωρίς όμως η διαφορά τους να παρουσιάζει στατιστικά σημαντικό χαρακτήρα ( $p = 0.190$ ). Κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (30<sup>th</sup> post-op day), όπως και στην άλλη ομάδα βραχείας θρομβοπροφύλαξης (ομάδα I), έδειξαν μια περαιτέρω αύξηση των επιπέδων τους, με στατιστικά σημαντικό χαρακτήρα, τόσο σε σχέση με αυτά κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day,  $p = 0.005$ ), όσο και ασφαλώς με αυτά της προεγχειρητικής περιόδου ( $p = 0.000$ ).

**Στην ομάδα IV** (4.500 IU of MLWH x 30 ημέρες), όπως και σε όλες τις άλλες ομάδες, η μέση τιμή των επιπέδων του VEGF κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day), αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά, σε σχέση με τα προεγχειρητικά επίπεδα ( $p = 0.000$ ). Όμως, όπως και στην άλλη ομάδα μακράς θρομβοπροφύλαξης (ομάδα II) και αντίθετα από τις ομάδες βραχείας θρομβοπροφύλαξης (ομάδες I και III), κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (30<sup>th</sup> post-op day), τα επίπεδα μειώθηκαν, σε σχέση με τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day) και μάλιστα η μείωση αυτή είχε στατιστικά σημαντικό χαρακτήρα ( $p = 0.000$ ). Επίσης, εύρημα ιδιαίτερης σπουδαιότητας, αποτελεί και το γεγονός, πως οι μέσες τιμές της 30<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας (30<sup>th</sup> post-op day), εμφανίζονταν να μη διαφέρουν καθόλου από αυτές της προεγχειρητικής περιόδου ( $p = 1.000$ ). Ουσιαστικά, σε αυτή την ομάδα ασθενών, στους οποίους χορηγήθηκε συνδυασμός αυξημένης δόσης LMWH (4,500 IU) και μακράς διάρκειας προφύλαξη (30 ημέρες), αποτέλεσε την μόνη ομάδα, στην οποία επετεύχθησαν επίπεδα τιμών του VEGF, κατά το τέλος του πρώτου μετεγχειρητικού μήνα, που να μη διαφέρουν από αυτά της προεγχειρητικής περιόδου.

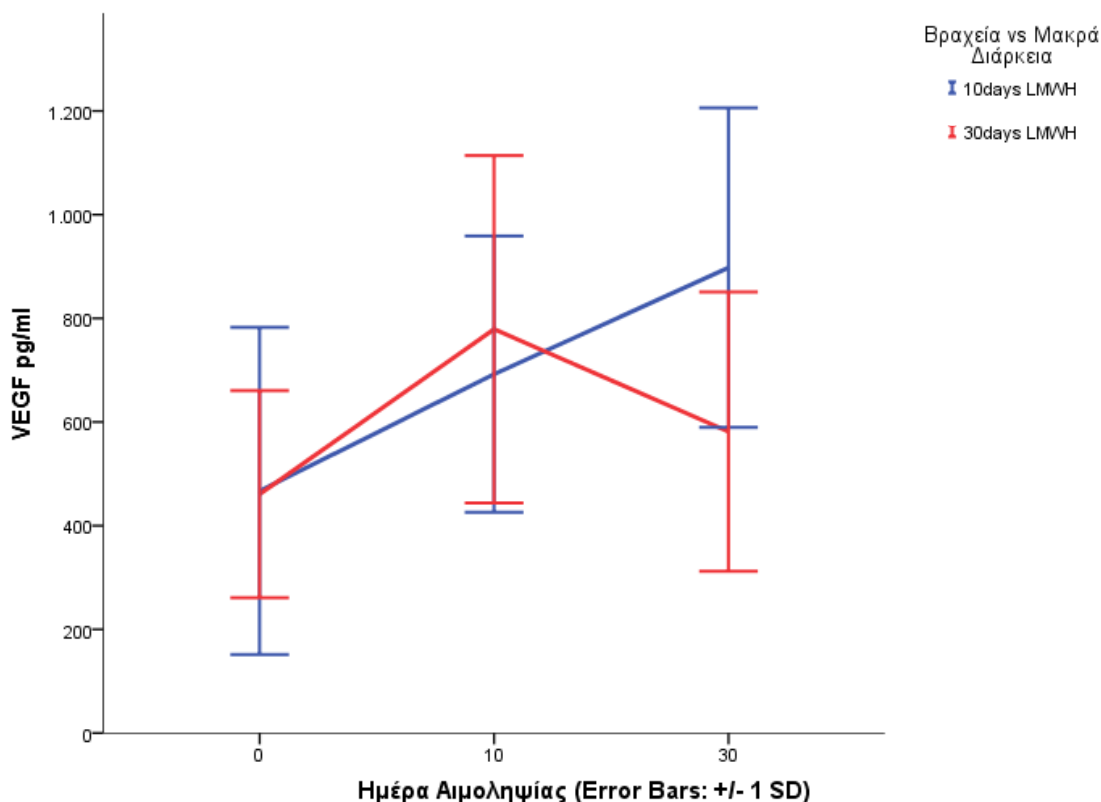
Τέλος, **στην ομάδα MUC**, παρά τον μικρό αριθμό ασθενών, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, πως παρότι τα προεγχειρητικά επίπεδα του VEGF, δεν διαφέρουν από τα αντίστοιχα των άλλων ομάδων, στις επόμενες φάσεις δειγματοληψίας, αυτά αυξάνονται κατακόρυφα, σε επίπεδα πολύ υψηλότερα από τις 4 βασικές ομάδες μελέτης ασθενών με αδενοκαρκινώματα μη βλεννώδους τύπου. Οι συγκεκριμένοι αυτοί ασθενείς, κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (10<sup>th</sup> post-op day), εμφανίζουν μια υπέρμετρη αύξηση των επιπέδων, υπερτριπλάσια σε σχέση με τις προεγχειρητικές τιμές ( $p = 0.000$ ) και υπερδιπλάσια από τις μέσες τιμές, όλων των άλλων ομάδων, στην αντίστοιχη χρονική στιγμή. Κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (30<sup>th</sup> post-op day), τα επίπεδα έδειξαν μια σημαντική κάμψη σε σχέση με αυτά της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας ( $p = 0.003$ ), όμως εξακολούθησαν να παραμένουν πολύ υψηλότερα από τα προεγχειρητικά ( $p = 0.000$ ) και ταυτόχρονα αρκετά υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα, όλων των άλλων ομάδων.

Για τον έλεγχο της πιθανής επίδρασης της διάρκειας της περιεγχειρητικής θρομβοπροφύλαξης, στη διακύμανση των επιπέδων του VEGF κατά την περιεγχειρητική περίοδο, αναλύθηκαν τα δεδομένα του συνόλου των ασθενών που έλαβαν LMWH για 10 μόνο ημέρες (ασθενείς ομάδων I και III), με αυτά εκείνων που έλαβαν LMWH για 30 ημέρες (ασθενείς ομάδων II και IV). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής καταγράφονται στον Πίνακα 8 και διαγραμματικά απεικονίζονται στο Σχήμα 11.

ΟΜΑΔΑ	pre-op	10th post-op	30th post-op
<b>ΒΡΑΧΕΙΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ</b> (ομάδες I + III)	467.1	692.3	897.8
<b>ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ</b> (ομάδες II + IV)	461.0	779.0	581.4
<i>P</i>	0.931	0.306	<b>0.000</b>

### Πίνακας 8.

Σύγκριση μέσων τιμών VEGF ασθενών με θρομβοπροφύλαξη βραχείας διάρκειας (ομάδες I + III) και αυτών με θρομβοπροφύλαξη μακράς διάρκειας (ομάδες II + IV).



### Σχήμα 11.

Επίπεδα VEGF, ομάδων βραχείας προφύλαξης (I + II) και ομάδων μακράς προφύλαξης (II + IV).

Από την παραπάνω σύγκριση προκύπτει ένα ιδιαίτερης αξίας εύρημα. Παρότι, οι μέσες τιμές των επιπέδων VEGF, για τις τέσσερις κύριες ομάδες μελέτης, δεν διαφέρουν, ούτε κατά την προεγχειρητική περίοδο ( $p = 0.931$ ), ούτε κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα ( $p = 0.306$ ), δεν συμβαίνει το ίδιο κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, όπου αυτές των ασθενών που έλαβαν βραχείας διάρκειας θρομβοπροφύλαξη, ήταν στατιστικά υψηλότερες, σε σχέση με αυτές των ασθενών που έλαβαν μακράς διάρκειας θρομβοπροφύλαξη ( $p = 0.000$ ). Όπως αναλύθηκε παραπάνω, αυτή η ομαλοποίηση των επιπέδων VEGF κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, προκύπτει κυρίως από τα αποτελέσματα της ομάδας IV, όπου χορηγήθηκε η υψηλότερη δόση LMWH (4.500 IU) και για μακρό διάστημα (30 ημέρες).

Στον Πίνακα 9, εμφανίζεται ο αριθμός των ασθενών κάθε ομάδας, ανάλογα με το στάδιο της νόσου, όπως αυτό ορίζεται με το σύστημα TNM, από την AJCC (American Joint Committee on Cancer).

Στον Πίνακα 10, γίνεται συσχέτιση της μέσης διαφοράς τιμών (ΜΔΤ) των επιπέδων του VEGF, ανάλογα με τη σταδιοποίηση των όγκων κατά AJCC και των παραμέτρων T (Tumor: μέγεθος όγκου) και N (Nodes: κατάσταση λεμφαδένων) κατά το σύστημα ταξινόμησης TNM.

Στον Πίνακα 11, παρατίθεται η σύγκριση των μέσων τιμών των επιπέδων του VEGF σε όλες τις ομάδες και στις διάφορες χρονικές στιγμές των αιμολησιών, σε σχέση με: α) την εντόπιση του όγκου (αριστερό/δεξιό κόλον), β) το στάδιο της νόσου (II/III), γ) το μεγέθους του όγκου (T2/T3/T4) και της κατάστασης των λεμφαδένων (N0/N1/N2) κατά το σύστημα TNM.

Από τα ευρήματα των Πινάκων 8 και 9, αναδεικνύονται ιδιαίτερα σημαντικά ευρήματα, για όλες τις ομάδες μελέτης.

ΟΜΑΔΕΣ	I	II	III	IV	MUC
ΣΤΑΔΙΟ I	1	1	1	0	0
ΣΤΑΔΙΟ II	6	6	3	5	2
ΣΤΑΔΙΟ III	4	8	9	10	3

**Πίνακας 9.**

Αριθμός ασθενών, για κάθε στάδιο της νόσου, ανά ομάδα μελέτης

	I			II			III			IV			MUC		
	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30
<b>ΕΝΤΟΠΙΣΗ</b>															
Αρ.κόλον	-	-	-	<b>0.007</b>	-	-	-	-	-	<b>0.000</b>	-	<b>0.003</b>	<b>0.027</b>	-	-
				-314						-500		489	-853		
Δεξ. κόλον	-	<b>0.017</b>	-	-	<b>0.011</b>	-	-	<b>0.006</b>	-	<b>0.016</b>	-	-	<b>0.012</b>	-	-
		-625			-281			-565		-294			-1394		
<b>ΣΤΑΔΙΟ*</b>															
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.012</b>	-	-
ΜΔΤ**													-1394		
III	-	-	-	<b>0.008</b>	-	-	-	<b>0.017</b>	-	<b>0.000</b>	-	<b>0.000</b>	<b>0.027</b>	-	-
ΜΔΤ				-302				-367		-529		503	-853		
<b>T</b>															
T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
ΜΔΤ															
T3	-	<b>0.032</b>	-	<b>0.025</b>	<b>0.024</b>	-	-	<b>0.025</b>	-	<b>0.001</b>	-	<b>0.016</b>	<b>0.008</b>	-	-
ΜΔΤ		-528		-195	-181			-374		-354		345	-1070		
T4	-	-	-	<b>0.044</b>	<b>0.011</b>	-	X	X	X	<b>0.002</b>	-	0.053	X	X	X
ΜΔΤ				-610	-712					-542		464			
<b>N</b>															
N0	-	-	-	-	<b>0.015</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΜΔΤ					-240										
N1	-	-	-	<b>0.020</b>	-	-	-	-	-	<b>0.002</b>	-	<b>0.013</b>	-	-	-
ΜΔΤ				-257						-465		766			
N2	-	-	-	<b>0.038</b>	<b>0.007</b>	-	-	-	-	<b>0.002</b>	-	<b>0.000</b>	-	-	-
ΜΔΤ				-610	-712					-626		766			

### **Πίνακας 10.**

Συσχέτιση μέσης διαφοράς τιμών επιπέδων του VEGF, ανάλογα με τη σταδιοποίηση των όγκων (κατά AJCC) και των παραμέτρων T και N (κατά TNM).

\*Στάδιο νόσου κατά AJCC (American Joint Committee on Cancer), \*\*ΜΔΤ: Μέση Διαφορά Τιμών, (0): pre-op day, (10): 10<sup>th</sup> post-op day, (30): 30<sup>th</sup> post-op day, -): μη στατιστικά σημαντική διαφορά, (X): μη εφικτή η σύγκριση,

	I			II			III			IV			MUC		
ΧΡΟΝΙΚΗ ΣΤΙΓΜΗ	0	10	30	0	10	30	0	10	30	0	10	30	0	10	30
<b>ΕΝΤΟΠΙΣΗ</b>															
Αρ./Δεξιό Κόλον	-	-	-	<b>0.000</b> 360	<b>0.000</b> 513	-	-	-	-	<b>0.001</b> 252	<b>0.003</b> 458	-	-	-	-
<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>															
II/III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.007</b>	<b>0.000</b>	-	-	-	-
<b>T</b>															
T2/T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
T2/T4	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
T3/T4	-	-	-	-	-	-	X	X	X	<b>0.041</b>	<b>0.039</b>	<b>0.032</b>	X	X	X
<b>N</b>															
N0 /N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.034</b>	<b>0.000</b>	<b>0.007</b>	-	<b>0.008</b>	-
N0 /N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.000</b>	-	-	<b>0.013</b>	-
N1/N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.025</b>	-	<b>0.003</b>	-

**Πίνακας 11.**

Σύγκριση μέσων τιμών των επιπέδων του VEGF σε όλες ομάδες και στις διάφορες χρονικές στιγμές, σε σχέση με: την εντόπιση του όγκου (αριστερό/δεξιό κόλον), το στάδιο (II/III), το μέγεθος του όγκου (T2/T3/T4) και της κατάστασης των λεμφαδένων (N0/N1/N2).

Παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές. (-): μη στατιστικά σημαντική διαφορά, (X): μη εφικτή η σύγκριση

#### 2.4.5 Ανάλυση επιπέδων VEGF, σε σχέση με ιστοπαθολογικές παραμέτρους

Σχετικά με το μέγεθος του όγκου T (κατά σύστημα κατάταξης TNM), το πλέον αξιοσημείωτο εύρημα εμφανίζεται και πάλι στην ομάδα που έλαβε την υψηλότερη δόση LMWH και για μακρά διάρκεια (ομάδα IV), με τη σημείωση, πως σε αυτή την ομάδα και κατά την ιστοπαθολογική μελέτη, δεν ανευρέθει κανένας ασθενής με όγκο T2.

Ενώ για τους όγκους T2, δεν παρατηρείται κάποια άξια λόγου επίδραση στην περιεγχειρητική διακύμανση των επιπέδων VEGF σε καμία ομάδα, δεν συμβαίνει το ίδιο για όγκους T3 και T4. Στους όγκους αυτούς, η υψηλή δόση LMWH και για μακρά διάρκεια χορήγησης (ομάδα IV) ήταν η μόνη, που κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα του VEGF, σε σχέση με τα επίπεδα της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα ομαλοποίησής τους, είτε με την έννοια της επαναφοράς τους στα επίπεδα των προεγχειρητικών τιμών για τους όγκους T4 ( $p = 0.053$ ), είτε ακόμη και μειώνοντάς τα για τους όγκους T3 ( $p = 0.016$ ).

Συσχετίζοντας τα δεδομένα, που προκύπτουν από τη περιεγχειρητική διακύμανση των επιπέδων VEGF στις διάφορες ομάδες, σε σχέση με την κατάσταση των τοπικοπεριοχικών λεμφαδένων, προκύπτουν ευρήματα ανάλογα με αυτά της συσχέτισής τους, με το μέγεθος του όγκου T. Το πλέον χαρακτηριστικό και ιδιαίτερης αξίας εύρημα, εμφανίζεται πάλι στην ομάδα IV. Σε αυτή την ομάδα της υψηλής δόσης LMWH και μακράς διάρκειας χορήγησης, τόσο για τους όγκους N1, όσο και για τους N2, τα επίπεδα του VEGF κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με αυτά κατά την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση ( $p = 0.013$  και  $p = 0.000$ , για τους N1 και N2 αντίστοιχα).

Εξαιρετικού και αναλόγου ενδιαφέροντος εύρημα, με τον παραπάνω περιγραφέντα ευεργετικό ρόλο της επίδρασης της υψηλής δόσης LMWH, όταν αυτή χορηγείται για μακρό διάστημα, στον έλεγχο της περιεγχειρητικής διακύμανσης των επιπέδων VEGF, προέκυψε και όταν αυτή αναλύθηκε, συσχετιζόμενη με το στάδιο της νόσου κατά AJCC.

Ενώ για τους όγκους σταδίου II, δεν παρατηρείται κάποια άξια λόγου επίδραση στην περιεγχειρητική διακύμανση των επιπέδων VEGF σε καμία ομάδα, δεν συμβαίνει το ίδιο για όγκους σταδίου III. Στους όγκους αυτούς, η υψηλή δόση LMWH και για μακρά διάρκεια χορήγησης (ομάδα IV) ήταν η μόνη, που κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα του VEGF, σε σχέση με τα επίπεδα της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας ( $p = 0.000$ ). Με βάση το εύρημα αυτό και σε συνδυασμό με τα δεδομένα των Πινάκων 5 και 6, φαίνεται πως το σχήμα της αυξημένης δόσης LMWH, για μακρά χρονική διάρκεια, έχει την πλέον

ευεργετική επίδραση στη διακύμανση των περιεγχειρητικών επιπέδων του VEGF, δίνοντας την καλύτερη δυνατότητα ομαλοποίησής τους, ιδιαίτερα στα πλέον προχωρημένα στάδια της νόσου.

Στην ομάδα I, αναδείχθηκε, ότι στους όγκους T3 υπήρξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα του VEGF ανάμεσα στις προεγχειρητικές τιμές και σε αυτές κατά την 30<sup>η</sup> ημέρα, για αυτό και η μέση διαφορά τιμών ήταν αρνητική. Οι λοιποί παράγοντες όπως το στάδιο και η λεμφαδενική διήθηση δεν είχαν κάποια ουσιαστική διαφορά.

Στην ομάδα II, οι ασθενείς σταδίου III παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερες τιμές VEGF την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα σε σύγκριση με αυτές προεγχειρητικά ( $p = 0.008$ ). Παρόμοια ήταν και τα ευρήματα, σε σχέση με την κατάσταση των λεμφαδένων (N). Στη σύγκριση των προεγχειρητικών τιμών, με αυτές της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας, οι όγκοι N1 και N2 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα του VEGF ( $p = 0.02$  και  $0.038$ , αντίστοιχα). Περαιτέρω και οι ασθενείς με αρνητική για λεμφαδένες νόσο, στη σύγκριση των προεγχειρητικών τιμών και αυτών της 30<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας, παρουσίασαν σημαντική στατιστικά αύξηση στον VEGF ( $p = 0.015$ ).

Στην ομάδα III, στη σύγκριση των όγκων μεγέθους T3, στις ίδιες χρονικές στιγμές, αναδεικνύεται ξανά στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p = 0.025$ )

Στην ομάδα IV, τα επίπεδα του VEGF εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ανάλογα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Οι ασθενείς σταδίου III παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση, κατά τη σύγκριση των προεγχειρητικών τιμών VEGF και αυτών της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας ( $p = 0.000$ ). Κατά τη σύγκριση των τιμών της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας με την 30<sup>η</sup> παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα VEGF ( $p = 0.000$ ).

Στην ομάδα MUC, όλοι οι ασθενείς είχαν όγκους T3 και αναδείχθηκε, πως τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, τα επίπεδα του VEGF, ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα, ανάλογα με το βαθμό λεμφαγγειακής διήθησης ( $p = 0.008$ ,  $p = 0.013$  και  $p = 0.03$ , για τη σύγκριση N0/N1, N0/N2 και N1/N2, αντίστοιχα). Στην ομάδα αυτή, με τη βλεννώδη ιστολογία, κατά την σύγκριση των επιπέδων VEGF προεγχειρητικά και την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, με αύξηση των τιμών, τόσο για ασθενείς σταδίου II, όσο και σταδίου III κατά TNM ( $p = 0.012$  και  $p = 0.027$ , αντίστοιχα).

Από την στατιστική ανάλυση με δεδομένων (independent *t*-test, Πίνακας 12), προκύπτει πως οι ασθενείς με εντόπιση των όγκων στο αριστερό κόλον, είχαν προεγχειρητικά επίπεδα VEGF υψηλότερα από αυτούς με εντόπιση στο δεξιό ( $p = 0.000$ ). Η ανάλογη σύγκριση όταν αφορά στη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα αποδίδει επίσης αντίστοιχη στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p = 0.015$ ). Κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, η διαφορά αυτή παύει να εμφανίζεται ( $p = 0.706$ ).

	ΕΠΙΠΕΔΑ VEGF pre-op day	ΕΠΙΠΕΔΑ VEGF 10 <sup>th</sup> post-op day	ΕΠΙΠΕΔΑ VEGF 30 <sup>th</sup> post-op day
<b>ΑΡΙΣΤΕΡΟ ΚΟΛΟΝ</b>	628	871	739
<b>ΔΕΞΙΟ ΚΟΛΟΝ</b>	324	651	705
<b><i>P</i></b>	<b>0.000</b>	<b>0.015</b>	<b>0.706</b>

**Πίνακας 12.**

Σύγκριση προεγχειρητικών επιπέδων του VEGF, ανάλογα με την ανατομική εντόπιση του όγκου.

Για τους ασθενείς με εντόπιση στο δεξιό κόλον, αυτό που είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, είναι πως παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του VEGF, όταν συγκρίθηκαν οι προεγχειρητικές τιμές, με αυτές κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, για τις ομάδες I, II, III ( $p = 0.017$ ,  $p = 0.011$  και  $p = 0.006$ , αντίστοιχα).

Στην ομάδα IV, δεν παρατηρείται η ίδια συμπεριφορά, που πιθανά οφείλεται, στην ήδη παρατηρηθείσα μείωση των επιπέδων του VEGF στην ομάδα αυτή, πιθανά λόγω της ευεργετικής επίδρασης της υψηλής δόσης και μακράς διάρκειας θρομβοπροφύλαξης.

Συμπερασματικά, αν και το δεξιό κόλον παρουσιάζει χαμηλότερες μέσες τιμές σε σχέση με την αριστερό κόλον προεγχειρητικά, φαίνεται πως η χειρουργική επέμβαση στην εντόπιση αυτή, αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του VEGF κατά την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, πιθανά αντανακλώντας μεγαλύτερης έντασης χειρουργικό τραύμα.



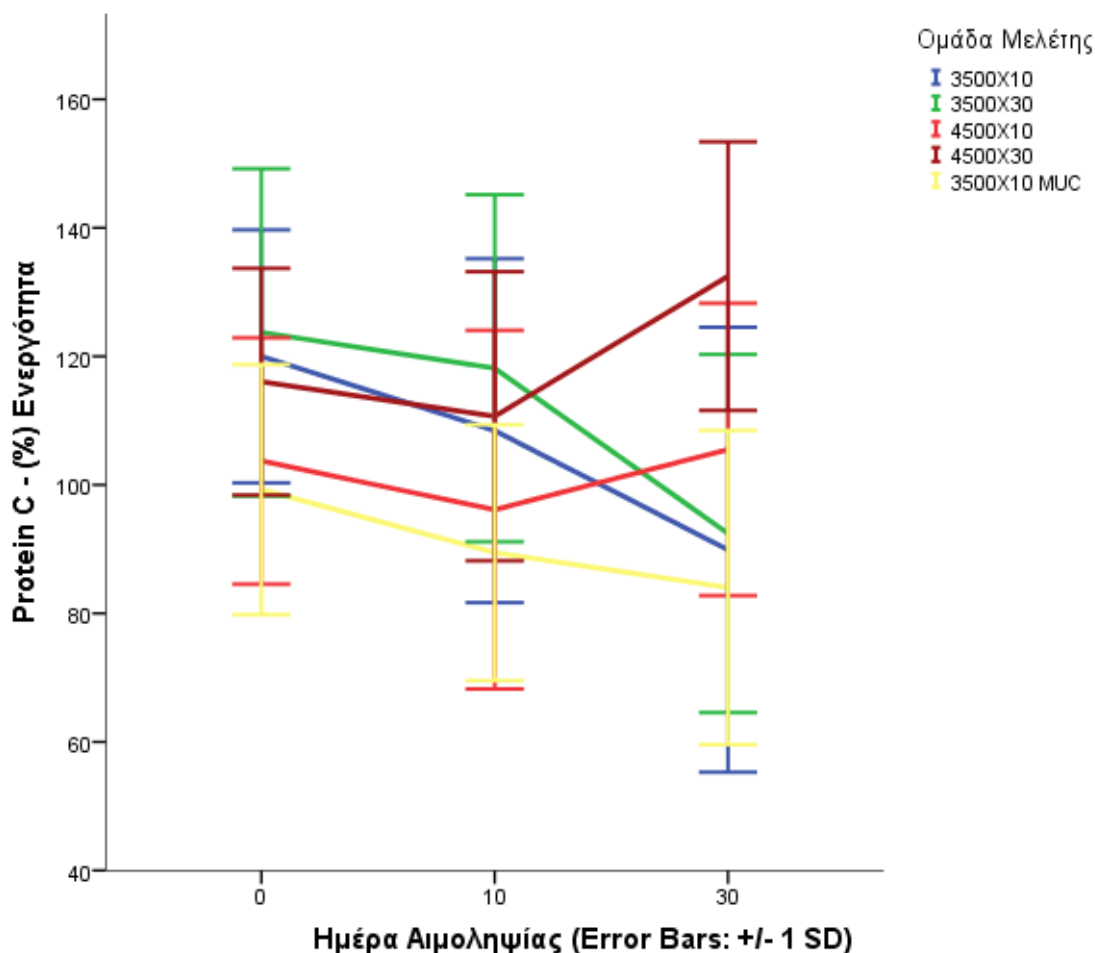
### 2.4.5 Αποτελέσματα ανάλυσης των επιπέδων της πρωτεΐνης C

Στον Πίνακα 13, αντιπαρατίθενται τα επίπεδα ενεργότητας της πρωτεΐνης C, για κάθε χρονική στιγμή και ανά ομάδα μελέτης και τα οποία απεικονίζονται γραφικά στο Σχήμα 12.

ΟΜΑΔΑ	I	II	III	IV	MUC
<b>pre-op day</b>	120±20	124±25	104±19	116±18	99±20
<b>10<sup>th</sup> post-op day</b>	108±27	118±27	96±28	111±23	89±20
<b>30<sup>th</sup> post-op day</b>	89±34	92±28	106±23	132±21	84±24

**Πίνακας 13.**

Επίπεδα ενεργότητας πρωτεΐνης C, στις διάφορες χρονικές στιγμές και ανά ομάδα μελέτης.  
Μέση τιμή ± SD, σε pg/mL



**Σχήμα 12.**

Επίπεδα ενεργότητας πρωτεΐνης C, στις διάφορες χρονικές στιγμές και ανά ομάδα μελέτης.

Στους Πίνακες 14 και 15, αναδεικνύονται οι τιμές ενεργότητας της protein C, ανά ομάδα μελέτης, στις διάφορες χρονικές στιγμές, σε σύγκριση κατά ζεύγη σε κάθε ομάδα ξεχωριστά.

Στην ομάδα I, αναδεικνύεται ότι ανάμεσα στην αρχική ενεργότητα της protein C και την ενεργότητα κατά την 30<sup>η</sup> ημέρα, υπάρχει μια σταδιακή μείωση αυτής που είναι στατιστικά

σημαντική ( $p = 0.019$ ). Οι προεγχειρητικές τιμές, σε σχέση με τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές.

ΟΜΑΔΑ	ΔΕΙΓΜΑ Α	ΔΕΙΓΜΑ Β	ΔΙΑΦΟΡΑ (Α – Β)	P
<b>I</b>	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	12	0,373
		30 <sup>th</sup> post-op day	30	<b>0,019</b>
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-12	0,373
		30 <sup>th</sup> post-op day	19	0,146
30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-30	<b>0,019</b>	
	10 <sup>th</sup> post-op day	-19	0,146	
<b>II</b>	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	6	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	31	<b>0,003</b>
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-6	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	26	<b>0,006</b>
30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-31	<b>0,003</b>	
	10 <sup>th</sup> post-op day	-26	<b>0,006</b>	
<b>III</b>	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	8	0,812
		30 <sup>th</sup> post-op day	-2	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-8	0,812
		30 <sup>th</sup> post-op day	-9	0,819
30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	10	1,000	
	10 <sup>th</sup> post-op day	8	0,819	
<b>IV</b>	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	5	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	-16	0,225
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-5	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	-22	<b>0,023</b>
30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	16	0,225	
	10 <sup>th</sup> post-op day	22	<b>0,023</b>	
<b>MUC</b>	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	10	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	15	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-10	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	5	1,000
30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	-15	1,000	
	10 <sup>th</sup> post-op day	-5	1,000	

#### **Πίνακας 14.**

Συγκριτική μελέτη επιπέδων protein C (κατά ζεύγη), για κάθε ομάδα.

Στην ομάδα II, αναδεικνύεται ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων της protein C, ανάμεσα στην προεγχειρητική περίοδο και την 30<sup>η</sup> ημέρα ( $p = 0.03$ ).

Στην ομάδα III, τα επίπεδα ενεργότητας της protein C, μεταβλήθηκαν διαφορετικά σε σύγκριση με τις δυο προηγούμενες ομάδες. Όπως αναδεικνύεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 14, δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές της ενεργότητας.

Στην ομάδα IV, οι αρχικές τιμές σε σύγκριση με την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα δεν παρουσιάζουν καμία ουσιώδη διαφορά. Όταν τα αποτελέσματα την 30<sup>η</sup> ημέρα συγκρίθηκαν με την

προεγχειρητική δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι τιμές την 10<sup>η</sup> και την 30<sup>η</sup> μέρα ήταν διαφορετικές, με αυτήν της 30<sup>ης</sup> ημέρας να εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας ( $p = 0.023$ ).

Τέλος στην ομάδα MUC, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές της ενεργότητας της protein C σε καμία χρονική στιγμή, σε σχέση με τα προεγχειρητικά τους επίπεδα.

ΧΡΟΝΙΚΗ ΣΤΙΓΜΗ	ΟΜΑΔΑ A	ΟΜΑΔΑ B	ΔΜΤ (A-B)	P
30 <sup>th</sup> post-op day	I	II	-2.5	1,000
		III	-15.6	1,000
		IV	-42.6	<b>0,002</b>
		MUC	5.9	1,000
	II	I	2.5	1,000
		III	-13.1	1,000
		IV	-40.1	<b>0,001</b>
		MUC	8.4	1,000
	III	I	15.6	1,000
		II	13.1	1,000
		IV	-27.0	0,092
		MUC	21.5	1,000
IV	I	42.6	<b>0,002</b>	
	II	40.1	<b>0,001</b>	
	III	27.0	0,092	
	MUC	48.5	<b>0,008</b>	
MUC	I	-5.9	1,000	
	II	-8.4	1,000	
	III	-21.5	1,000	
	IV	-48.5	<b>0,008</b>	

### Πίνακας 15.

Συγκριτική μελέτη επιπέδων protein C (ανά ζεύγη), όλων των ομάδων, στα διάφορα χρονικά διαστήματα.

ΟΜΑΔΑ ΔΕΙΓΜΑ	I			II			III			IV			MUC		
	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30
<b>ΕΝΤΟΠΙΣΗ</b>															
αρ. κόλον	-	-	<b>0.024</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.001</b>	-	-	-
ΜΔΤ		-	30									-31			
δεξ. κόλον	-	-	-	-	<b>0.028</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΜΔΤ					45										
<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>															
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.000</b>	-	-	-
ΜΔΤ												-32			
<b>T</b>															
T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
T3	-	<b>0.016</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.020</b>	-	-	-
ΜΔΤ		41										-19			
T4	-	-	-	<b>0.028</b>	-	-	X	X	X	-	-	<b>0.028</b>	X	X	X
ΜΔΤ				24								-30			
<b>N</b>															
N0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.001</b>	0,090	-	-
ΜΔΤ												-25	22		
N2	-	-	-	<b>0.019</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.000</b>	-	-	-
ΜΔΤ				24								-41			

**Πίνακας 16.**

Συσχέτιση επιπέδων ενεργότητας πρωτεΐνης C, με T, N, εντόπιση και στάδιο της νόσου.

ΜΔΤ: Μέση Διαφορά Τιμής.

ΟΜΑΔΑ	I			II			III			IV			MUC		
ΔΕΙΓΜΑ	0	10	30	0	10	30	0	10	30	0	10	30	0	10	30
<b>ΕΝΤΟΠΙΣΗ</b> αρ/δεξ. κόλον	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.023</b>	-	-	-	-
<b>ΣΤΑΔΙΟ</b> II/III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.023</b>	-	-	-	-
<b>T</b>															
T2/T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
T2/T4	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
T3/T4	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	X	X	X
<b>N</b>															
N0 /N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N0 /N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1/N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Πίνακας 17.**

Σύγκριση επιπέδων ενεργότητας πρωτεΐνης C, με το T, N, εντόπιση και στάδιο της νόσου.

Συγκρίνοντας τις τιμές ενεργότητας της protein C, τόσο κατά την προεγχειρητική περίοδο, όσο και κατά την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, μεταξύ των διαφόρων ομάδων, δεν αναδείχθηκε καμία ουσιαστική διαφορά. Όμως, κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, η ομάδα IV παρουσίαζε υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας, σε σύγκριση με τις ομάδες I και II ( $p = 0.002$  και  $p = 0.001$ , αντίστοιχα).

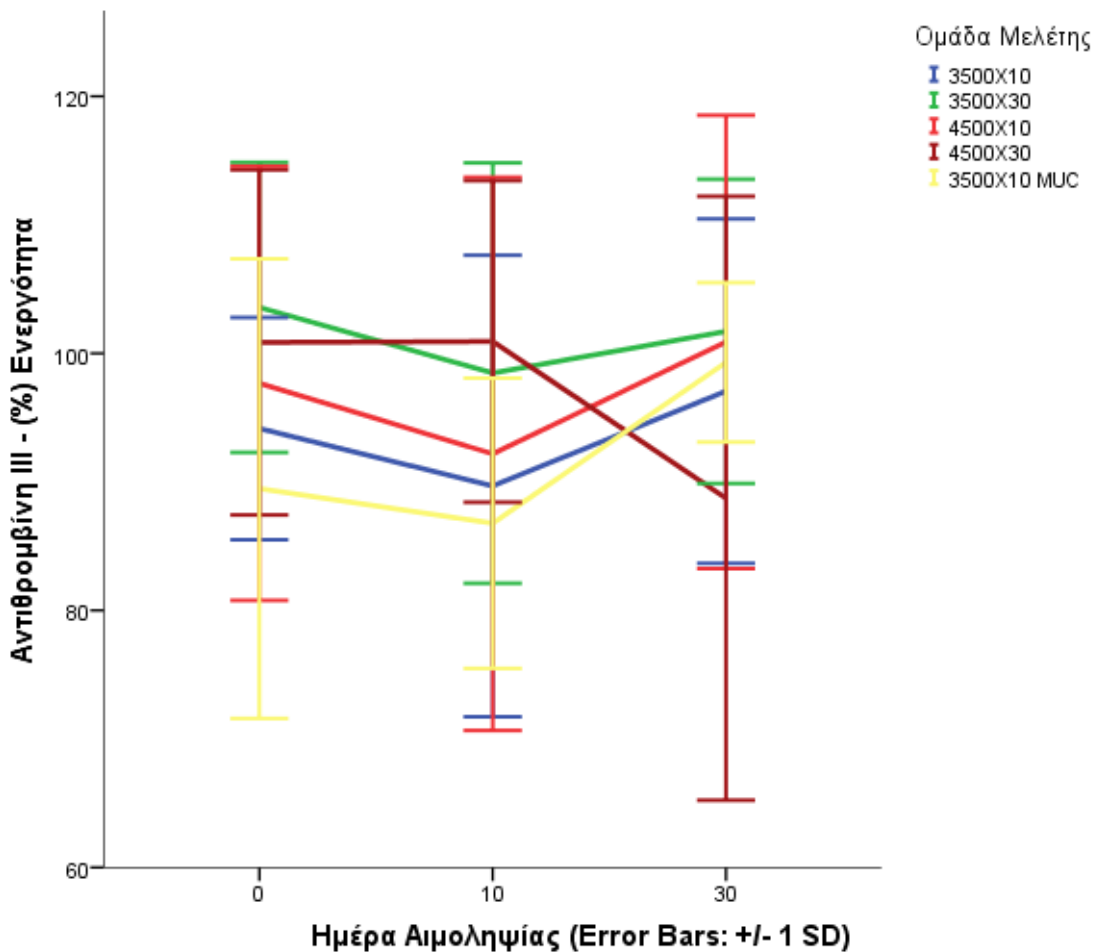
Στον Πίνακα 16, αναφέρονται οι συσχετίσεις των ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών, σε σχέση με τα επίπεδα ενεργότητας της πρωτεΐνης C. Όπως φαίνεται, στην ομάδα IV, οι τιμές κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα ήταν σημαντικά υψηλότερες, σε σχέση με αυτές της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας, για την αριστερή εντόπιση του όγκου, το μέγεθός του (T3 και T4), το στάδιό του (III) και το επίπεδο λεμφαδενικής διήθησης (N1 και N2), ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.000$ ,  $p = 0.020$ ,  $p = 0.028$ ,  $p = 0.001$  και  $p = 0.000$ , αντίστοιχα).

Από τους υπόλοιπες ομάδες, αναδεικνύεται ότι μόνο στην ομάδα II εμφανίζονταν στατιστική διαφορά, όταν συγκρίνονταν τα επίπεδα ενεργότητας κατά την προεγχειρητική περίοδο, με αυτά κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα για όγκους T4 και N2 ( $p = 0.028$  και  $p = 0.029$ , αντίστοιχα).

Στον Πίνακα 17, αναδεικνύεται ότι παρουσιάστηκαν υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας, κατά την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, για όγκους εντοπιζόμενους στο δεξιό κόλον, σε σχέση με το αριστερό, όπως επίσης και για όγκους σταδίου III, σε σχέση με όγκους σταδίου II ( $p = 0.023$  και  $p = 0.023$ , αντίστοιχα).

### 2.4.6 Αποτελέσματα ανάλυσης επιπέδων αντιθρομβίνης III

Παρακάτω αντιπαρατίθενται τα επίπεδα ενεργότητας της αντιθρομβίνης III, ανά ομάδα ασθενών.



**Σχήμα 13.**

Επίπεδα ενεργότητας ATIII, στις διάφορες χρονικές στιγμές, για κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	I	II	III	IV	MUC
	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD
<b>pre-op</b>	94±9	104±11	98±17	101±13	89±18
<b>10<sup>th</sup> post-op day</b>	90±18	98±16	92±22	101±12	87±11
<b>30<sup>th</sup> post-op day</b>	97±14	102±12	101±18	89±23	99±6

**Πίνακας 18.**

Επίπεδα ενεργότητας ATIII, στις διάφορες χρονικές στιγμές, για κάθε ομάδα.

Στον Πίνακα 18, αναδεικνύονται οι μέσες τιμές των επιπέδων της ATIII, για την κάθε ομάδα ξεχωριστά. Δεν αναδείχτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, στις διάφορες χρονικές στιγμές, για καμία ομάδα.

Στον Πίνακα 19, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης των επιπέδων ενεργότητας της ΑΤΠΙΙ, κατά ζεύγη, ανά ομάδα μελέτης.

Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά, αναδείχθηκε στην ομάδα IV και στη σύγκριση των επιπέδων ενεργότητας, ανάμεσα σε αυτή της προεγχειρητικής περιόδου και της 30<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας, με την τιμή της δεύτερης περιόδου να μειώνεται αισθητά ( $p = 0.019$ ). Λαμβάνοντας υπόψη και τα δεδομένα του Πίνακα 20, φαίνεται πως η διαφορά αυτή προκύπτει κυρίως από την αντίστοιχη μεταβολή, που παρατηρείται σε όγκους με εκτεταμένη λεμφαδενική διήθηση (N2).

ΟΜΑΔΑ	ΔΕΙΓΜΑ Α	ΔΕΙΓΜΑ Β	A - B	P
<b>I</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	4,5	0,928
		30 <sup>th</sup> post-op day	-2,9	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	-4,5	0,928
		30 <sup>th</sup> post-op day	-7,3	0,705
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	2,9	1,000
		10 <sup>th</sup> post-op day	7,3	0,705
<b>II</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	5,1	0,530
		30 <sup>th</sup> post-op day	1,9	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	-5,1	0,530
		30 <sup>th</sup> post-op day	-3,2	1,000
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	-1,9	1,000
		10 <sup>th</sup> post-op day	3,2	1,000
<b>III</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	5,5	0,527
		30 <sup>th</sup> post-op day	-3,2	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	-5,5	0,527
		30 <sup>th</sup> post-op day	-8,7	0,386
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	3,2	1,000
		10 <sup>th</sup> post-op day	8,7	0,386
<b>IV</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	-0,1	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	12	<b>0,009</b>
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	0,1	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	12	0,072
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	-12	<b>0,009</b>
		10 <sup>th</sup> post-op day	-12	0,072
<b>MUC</b>	pre-op	10 <sup>th</sup> post-op day	2,7	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	-9,8	0,462
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	-2,7	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	-12,5	0,525
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op	9,8	0,462
		10 <sup>th</sup> post-op day	12,5	0,525

### Πίνακας 19.

Συγκριτική επιπέδων ενεργότητας ΑΤΠΙΙ, για κάθε ομάδα, στις διάφορες χρονικές στιγμές

Στον Πίνακα 21, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη σύγκριση κατά ζεύγη, των ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών, σε σχέση με τα επίπεδα ενεργότητας της ΑΤΠΙΙ. Στατιστικά σημαντικές διαφορές αναδεικνύονται μόνο στην ομάδα IV.

Το μέγεθος του όγκου εμφάνιζε στατιστική διαφορά στις προεγχειρητικές τιμές, ανάμεσα σε όγκους T3 και T4, με υψηλότερες τιμές ενεργότητας στους όγκους T3. Αντίστοιχο εύρημα



παρατηρείται και σε σχέση με το βαθμό λεμφαγγειακής διήθησης, με τους όγκους N0 να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας, τόσο προεγχειρητικά, όσο και κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με τους όγκους N2.

ΟΜΑΔΑ	I			II			III			IV			MUC		
ΔΕΙΓΜΑ	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30
<b>ΕΝΤΟΠΙΣΗ</b>															
αρ. κόλον	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.011</b> -17
δεξ. κόλον	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>															
II ΜΔΤ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III ΜΔΤ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>T</b>															
T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
T4	-	-	-	-	-	-	X	X	X				X	X	X
<b>N</b>															
N0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.003</b> 29,4	<b>0.004</b> 40,0	-	-	-

**Πίνακας 20.**

Συσχέτιση επιπέδων ενεργότητας ΑΤΙΙΙ, με T, N, εντόπιση και στάδιο της νόσου.

ΟΜΑΔΑ	I			II			III			IV			MUC		
ΔΕΙΓΜΑ	0	10	30	0	10	30	0	10	30	0	10	30	0	10	30
ΕΝΤΟΠΙΣΗ αρ./δεξ. κόλον	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΣΤΑΔΙΟ II/III ΜΔΤ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.007</b> 18.3	-	-	-	-	-
T															
T2/T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
T2/T4	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
T3/T4 ΜΔΤ	-	-	-	-	-	-	X	X	X	<b>0.031</b> 16.0	-	-	X	X	X
N															
N0 /N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N0 /N2 ΜΔΤ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.016</b> 23.2	-	<b>0.003</b> 44.8	-	-	-
N1/N2 ΜΔΤ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.019</b> <b>33.6</b>	-	-	-

**Πίνακας 21.**

Σύγκριση επιπέδων ενεργότητας ΑΤIII, με T, N, εντόπιση και στάδιο της νόσου.

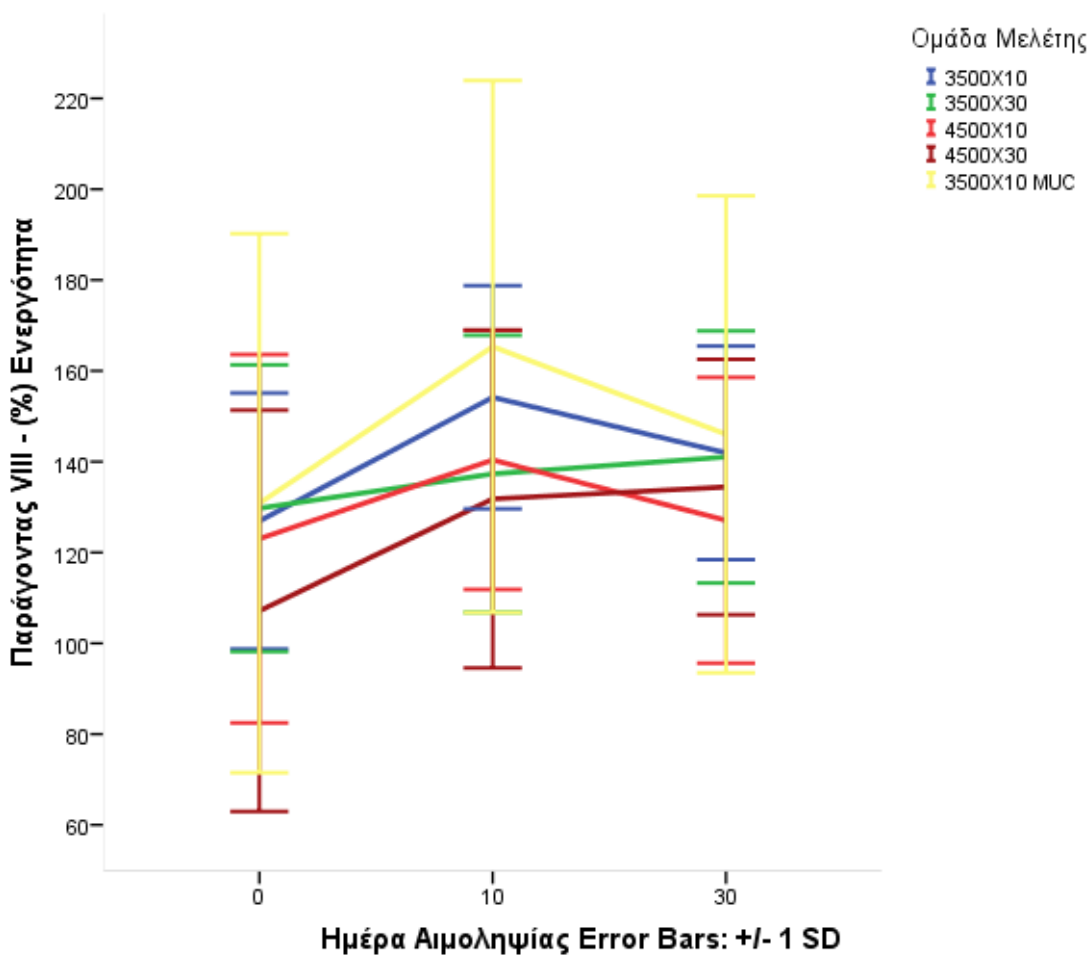
### 2.4.7 Αποτελέσματα ανάλυσης επιπέδων παράγοντα VIII

Στον Πίνακα 22, παρατίθενται οι μέσες τιμές και η απόκλιση των επιπέδων ενεργότητας του παράγοντα VIII, ανά ομάδα ασθενών της μελέτης και απεικονίζονται γραφικά στο Σχήμα 14.

ΟΜΑΔΕΣ	I	II	III	IV	MUC
pre-op day	127±28	130±32	123±41	107±44	131±39
10 <sup>th</sup> post-op day	154±25	137±30	140±29	132±37	165±59
30 <sup>th</sup> post-op day	142±23	141±28	127±32	134±28	146±53

**Πίνακας 22.**

Επίπεδα ενεργότητας παράγοντα VIII, στις διάφορες χρονικές στιγμές και για κάθε ομάδα.



**Σχήμα 14.**

Επίπεδα ενεργότητας του παράγοντα VIII, στις διάφορες χρονικές στιγμές, για κάθε ομάδα.

Δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των επιπέδων ενεργότητας του παράγοντα VIII, για καμία χρονική στιγμή αιμοληψίας, ανάμεσα στις ομάδες μελέτης.

Όταν έγινε συγκριτική ανάλυση κατά ζεύγη, ανά ομάδα μελέτης, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάστηκαν στις ομάδες I και IV. Στην ομάδα I, εμφανίστηκαν αυξημένα επίπεδα ενεργότητας, κατά την προεγχειρητική περίοδο, σε σχέση με την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα ( $p = 0.022$ ). Στην ομάδα IV, τα επίπεδα ενεργότητας αυξήθηκαν και κατά την 10<sup>η</sup> και κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα ( $p = 0.015$  και  $p = 0.018$ , αντίστοιχα).

ΟΜΑΔΑ	ΔΕΙΓΜΑ Α	ΔΕΙΓΜΑ Β	A - B	P
I	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	-27.3	<b>0,022</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-15.0	0,546
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	27.3	<b>0,022</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	12.3	0,652
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	15.0	0,546
		10 <sup>th</sup> post-op day	-12.3	0,652
II	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	-7.6	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	-11.3	0,720
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	7.6	1,000
		30 <sup>th</sup> post-op day	-3.7	1,000
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	11.3	0,720
		10 <sup>th</sup> post-op day	3.7	1,000
III	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	-17.3	0,179
		30 <sup>th</sup> post-op day	-4.0	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	17.3	0,179
		30 <sup>th</sup> post-op day	13.3	0,442
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	4.0	1,000
		10 <sup>th</sup> post-op day	-13.3	0,442
IV	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	-24.6	<b>0,015</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-27.3	<b>0,018</b>
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	24.6	<b>0,015</b>
		30 <sup>th</sup> post-op day	-2.6	1,000
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	27.2	<b>0,018</b>
		10 <sup>th</sup> post-op day	2.6	1,000
MUC	pre-op day	10 <sup>th</sup> post-op day	-34.5	0,064
		30 <sup>th</sup> post-op day	-15.2	1,000
	10 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	34.5	0,064
		30 <sup>th</sup> post-op day	19.3	0,574
	30 <sup>th</sup> post-op day	pre-op day	15.2	1,000
		10 <sup>th</sup> post-op day	-19.3	0,574

**Πίνακας 23.**

Σύγκριση επιπέδων ενεργότητας παράγοντα VIII, για κάθε ομάδα.

Στην ομάδα MUC δεν αναδείχθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την ενεργότητα του παράγοντα VIII, σε καμία χρονική στιγμή.

Στον Πίνακα 24, εμφανίζονται τα δεδομένα της συσχέτισης των επιπέδων ενεργότητας του παράγοντα VIII, σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου. Όπως και για τους άλλους παράγοντες, φαίνεται πως η εκτεταμένη λεμφαδενική διήθηση και εξ' αυτού και το προχωρημένο στάδιο της νόσου, αυξάνουν την ενεργότητα του παράγοντα VIII.

ΟΜΑΔΑ	I			II			III			IV			MUC		
	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30	0/10	0/30	10/30
<b>ΕΝΤΟΠΙΣΗ</b>															
Αρ. κόλον	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.015</b>	-	-	-	-	-
										-34					
Δεξ. κόλον	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>															
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΜΔΤ															
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.000</b>	<b>0.011</b>	-	-	-	-
ΜΔΤ										-38.4	-44.0				
<b>T</b>															
T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	X	X	X
<b>N</b>															
N0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1	-	<b>0.015</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.019</b>	-	-	-	-	-
		-27.7								24.2					
N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	-	-	-	-
										59.8	-80.9				

**Πίνακας 24.**

Συσχέτιση επιπέδων ενεργότητας παράγοντα III, με T, N, εντόπισης και στάδιο της νόσου.

## 2.5 Συζήτηση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης ανέδειξε, ότι τα επίπεδα του VEGF στον ορό ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του παχέος εντέρου, παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές, κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου, μετά από R0 θεραπευτική εκτομή του όγκου και για τουλάχιστον τις πρώτες 30 ημέρες. Ανεξάρτητα της δόσης και της διάρκειας της ηπαρίνης μικρού μοριακού βάρους, που χορηγείται για περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη, όλοι οι ασθενείς εμφανίζουν αύξηση των επιπέδων κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με αυτά που μετρώνται προεγχειρητικά. Η αύξηση αυτή πιθανά οφείλεται στην αναγκαία επουλωτική διαδικασία, που ακολουθεί το προηγηθέν χειρουργικό τραύμα. Το εύρημα αυτό είναι αντίστοιχο, τόσο με ευρήματα από πειραματικά μοντέλα επούλωσης σε ζώα, όσο και με ευρήματα σε κλινικές μελέτες ασθενών με νεοπλασματική νόσο.<sup>195-197</sup> Σε αυτά φαίνεται, όπως και στη δική μας μελέτη, πως τα επίπεδα του VEGF αυξάνονται μετεγχειρητικά και η αύξηση αυτή διατηρείται για τουλάχιστον μία εβδομάδα, τα δε επίπεδα αυτά είναι υψηλότερα σε ασθενείς που χειρουργήθηκαν για νεοπλασματική νόσο, από αυτά ασθενών που χειρουργήθηκαν για καλοήθεις αιτίες.

Πιθανή εξήγηση της μετεγχειρητικής αύξησης των επιπέδων του VEGF, μπορεί να είναι η αύξηση της έκκρισής του, είτε λόγω τοπικής του απελευθέρωσης από κυτταρικά στοιχεία των ιστών που βρίσκονται στην πορεία του χειρουργικού τραύματος, είτε από κύτταρα της αιματικής κυκλοφορίας.

Τα πρώτα είναι κύτταρα που εμπλέκονται στους τοπικούς μηχανισμούς της επουλωτικής διαδικασίας, ενώ στα δεύτερα ανήκουν κυρίως τα αιμοπετάλια. Στη μελέτη των Hornbrey *et al.*, αναδείχθηκε, πως σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, η μετεγχειρητική αύξηση του κυκλοφορούντος VEGF δεν προέρχονταν από την περιοχή του τραύματος, αλλά από άλλη εστία.<sup>161</sup>

Είναι γνωστό, πως τα αιμοπετάλια αποτελούν την κύρια δεξαμενή VEGF και ενεργοποιούμενα στα πλαίσια της συμμετοχής τους στους μηχανισμούς της πρωτοπαθούς αιμόστασης, συσσωρεύονται στην περιοχή του τραύματος και πιθανά εκκρίνουν σημαντικά ποσά του αγγειογενετικού παράγοντα. Σε διάφορες μελέτες έχει φανεί, πως άμεσα μετεγχειρητικά, ο αριθμός των αιμοπεταλίων και η ενεργότητά τους, συχνά, αυξάνει.<sup>162</sup> Σε δική μας μελέτη, έχουμε αναδείξει ότι η χειρουργική επέμβαση αυξάνει την ενεργοποίησή τους, για τις δέκα τουλάχιστον πρώτες ημέρες μετεγχειρητικά, ιδιαίτερα στους ογκολογικούς ασθενείς.<sup>163</sup>

Κατά τις επόμενες 20 ημέρες, η διακύμανση των επιπέδων του VEGF διαφοροποιήθηκε ανάλογα με το σχήμα της περιεγχειρητικής θρομβοπροφύλαξης. Σε όσους ασθενείς χρησιμοποιήθηκε βραχείας διάρκειας θρομβοπροφύλαξη (για 10 δηλαδή ημέρες) και ανεξάρτητα της δόσης της χορηγούμενης LMWH, αυτά συνέχισαν να αυξάνονται. Αντίθετα, όσοι ασθενείς

έλαβαν μακράς διάρκειας θρομβοπροφύλαξη (για 30 δηλαδή ημέρες), κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, εμφάνισαν μείωση των επιπέδων του VEGF. Όμως, το εύρημα αυτό είχε στατιστικά σημαντικό χαρακτήρα, μόνο στην ομάδα IV, που έλαβε μακράς διάρκειας θρομβοπροφύλαξη, με την αυξημένη δόση LMWH (4.500 IU τινζαπαρίνης x 30 ημέρες). Επίσης, κατά τη χρονική αυτή στιγμή, την 30<sup>η</sup> δηλαδή μετεγχειρητική ημέρα, μόνο οι ασθενείς της ίδιας ομάδας εμφάνισαν τιμές επιπέδων του VEGF αντίστοιχες των προεγχειρητικών, ενώ σε όλες τις άλλες ομάδες αυτά εξακολούθησαν να εμφανίζονται αυξημένα. Στην άλλη ομάδα με θρομβοπροφύλαξη μακράς διάρκειας, δηλαδή την ομάδα II, παρά τη μείωση των τιμών κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με την 10<sup>η</sup>, αυτές εξακολουθούσαν να ανευρίσκονται αυξημένα, σε σχέση με την προεγχειρητική περίοδο.

Συνάγεται λοιπόν, πως όχι μόνο η μακράς διάρκειας θρομβοπροφύλαξη, αλλά αυτή σε συνδυασμό με υψηλότερη δόση, είναι σε θέση να ομαλοποιήσει τα επίπεδα του αγγειογενετικού παράγοντα. Πρόκειται για ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα, που ενισχύει περαιτέρω τη σύσταση για μακράς διάρκειας θρομβοπροφύλαξη, με αυξημένες δόσεις LMWH, η οποία προτείνεται τα τελευταία χρόνια, από όλες τις σχετικές επιστημονικές εταιρείες. Και ενώ η σύσταση αυτή έχει σαν στόχο την αποτελεσματικότερη περιεγχειρητική προφύλαξη των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, από την ανάπτυξη θρομβοεμβολικών επεισοδίων, το δικό μας εύρημα προσθέτει στη σύσταση αυτή, το πλεονέκτημα της ομαλότερης διακύμανσης των επιπέδων του κύριου αγγειογενετικού παράγοντα, στην κρίσιμη αυτή περίοδο. Είναι γνωστό, πως ήδη υπάρχουν τουλάχιστον δύο εγκεκριμένα σχήματα παρηγορικής θεραπείας, που περιλαμβάνουν αντι-VEGF παράγοντες, στην αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, σταδίου IV. Αυτοί οι παράγοντες, όπως και το σύνολο των άλλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων, δεν μπορούν να χορηγηθούν άμεσα μετεγχειρητικά, αλλά μόνο μετά την παρέλευση 4 έως 6 εβδομάδων. Από τη στιγμή λοιπόν που αποδεχόμαστε ένα πιθανά ωφέλιμο ρόλο των αντι-VEGF θεραπειών, στη διαχείριση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, το εύρημα της μελέτης μας, μπορεί να έχει καθοριστική σημασία, μιας και αποδεικνύει, πως το συνιστώμενο σχήμα θρομβοπροφύλαξης, προσφέρει ταυτόχρονα το πλεονέκτημα της ομαλοποίησης των επιπέδων του VEGF, χωρίς τον κίνδυνο της χρήσης αντι-VEGF παραγόντων.

Είναι γνωστό, πως οι συμπαγείς όγκοι, κατά τη φάση ανάπτυξης του μεγέθους και της μεταστατικής τους δυναμικής, εκκρίνουν παράγοντες που δρουν, τόσο ευοδωτικά για την αγγειογένεση, όσο και ανασταλτικά. Για παράδειγμα, μπορεί να εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο VEGF, σαν απάντηση στην υποξία που προκαλείται λόγω της ταχείας ανάπτυξής τους, αλλά ταυτόχρονα, μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, και



αγγειοστατίνης και ενδοστατίνης, που περιορίζουν τη δημιουργία νέων τροφοφόρων αγγείων.<sup>164,165</sup> Το αποτέλεσμα τέτοιων, διπλής κατεύθυνσης, ανατροφοδοτήσεων, σε μεγάλο βαθμό προδικάζουν και την πορεία ανάπτυξης και τη δυνατότητα μετάστασής τους. Τόσο προκλινικά, όσο και κλινικά μοντέλα επιβεβαιώνουν το σημαντικό ρόλο του VEGF και της αγγειογένεσης, στην πρόοδο και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Σε κυτταρικές σειρές, βρέθηκε, ότι οι όγκοι που εκφράζουν VEGF, είχαν μεγαλύτερη μικροαγγειακή πυκνότητα και μεταστατική δυναμική, σε σχέση με σειρές χωρίς έκφραση VEGF.<sup>166</sup> Από πολλές κλινικές μελέτες επίσης φαίνεται, ότι ο VEGF αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου.<sup>167,168</sup> Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και από μια μέτα-ανάλυση 27 μελετών.<sup>169</sup>

Θεωρητικά, η πλήρης εξαίρεση του όγκου (R0 εκτομή) θα έπρεπε να ανακόπτει την όποια πιθανότητα υποτροπής και μετάστασής του. Όμως, όπως είναι γνωστό, αυτό δεν συμβαίνει σε ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών. Η αιτία της υποτροπής, ή και της μετάστασης εξαιρεθέντων όγκων, πιθανά να οφείλεται, είτε σε νεοπλασματικά κύτταρα που κυκλοφορούν ελεύθερα, ήδη κατά την φάση της χειρουργικής παρέμβασης, είτε σε μικρές εστίες «κοιμώμενων» (dormant) νεοπλασματικών κυττάρων. Πολλά ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν, ότι ένα περιβάλλον εμπλουτισμένο με αυξητικούς παράγοντες, καθιστά δυνατή την περαιτέρω επιβίωση τέτοιων καρκινικών κυττάρων, που παρά τη θεραπευτική εκτομή του όγκου, παραμένουν στην περιοχή ή και στη συστηματική κυκλοφορία.<sup>170,171</sup> Η άμεση μετεγχειρητική περίοδος, όπως αποδείχθηκε και στη δική μας μελέτη, αναπαριστά ένα τέτοιο περιβάλλον, λόγω της κυκλοφορίας αυξημένων επιπέδων του κύριου αγγειογενετικού παράγοντα. Ο αποτελεσματικότερος έλεγχος της διακύμανσης και ομαλοποίησης των μετεγχειρητικών επιπέδων του VEGF, που επιτυγχάνεται με τη χορήγηση υψηλής δόσης LMWH και για μακρά χρονική διάρκεια, πιθανά να προσφέρει μια καινούρια προσέγγιση στη διαχείριση των ογκολογικών ασθενών, με πιθανότητες θετικού επηρεασμού των ποσοστών τοπικής υποτροπής και μεταστάσεων, σε ένα μεταγενέστερο στάδιο. Βεβαίως, η διερεύνηση ενός τέτοιου ενδεχομένου απαιτεί την διεξαγωγή μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και μακρά παρακολούθησή τους. Επίσης, μελέτες με ανάλογο σχεδιασμό, θα μπορούσαν να διερευνήσουν την υπόθεση της αυξημένης παραγωγής VEGF από τα ενεργοποιηθέντα από το εγχειρητικό τραύμα αιμοπετάλια και της πιθανής αναστολής τους, μέσω χορήγησης αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο.

Ο καρκίνος είναι μια ετερογενής νόσος, που συνοδεύεται και από υπερπηκτικότητα, ο βαθμός της οποίας φαίνεται να εξαρτάται από την ανατομική εντόπιση, τον ιστολογικό τύπο και το μέγεθος του όγκου, το βαθμό λεμφαγγειακής προσβολής, το στάδιο της νόσου και την ακολουθούμενη θεραπευτική προσέγγιση.<sup>172</sup>

Τα κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου του παχέος εντέρου, όπως το HNPCC και το FAP, εμφανίζουν ένα βαθμό εκλεκτικής εντόπισης, στο δεξιό και αριστερό κόλον, αντίστοιχα. Η εκλεκτικότητα αυτή πιθανά σχετίζεται με ιδιαίτερα μοριακά ή χρωμοσωμικά χαρακτηριστικά, όπως η μικροδορυφορική αστάθεια και φαινότυπους μεθυλίωσης και χρωμοσωμική αστάθεια, για τους παραπάνω όγκους αντίστοιχα.<sup>173</sup>

Στη δική μας μελέτη, προκύπτει πως οι ασθενείς με εντόπιση των όγκων στο αριστερό κόλον, είχαν υψηλότερα επίπεδα VEGF, τόσο προεγχειρητικά, όσο και κατά τη 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα. Όμως, ενώ σε αυτούς, τα επίπεδα αυτά δεν φαίνεται να μεταβάλλονται μετεγχειρητικά, δεν φαίνεται να συμβαίνει το ίδιο και για τους όγκους με εντόπιση στο δεξιό κόλον. Στους τελευταίους παρατηρείται σημαντική άνοδος των επιπέδων, σε όλη τη μετεγχειρητική περίοδο παρακολούθησης, γεγονός που ίσως αντανακλά το μεγαλύτερο χειρουργικό τραύμα, που συνήθως συνεπάγεται η δεξιά ημικολεκτομή, σε σχέση με την αριστερή ημικολεκτομή ή τη σιγμοειδεκτομή.

Σχετικά με το μέγεθος του όγκου, από τη μελέτη μας προκύπτει, πως ενώ για τους όγκους T2, δεν παρατηρείται κάποια αξία λόγω επίδραση στην περιεγχειρητική διακύμανση των επιπέδων VEGF σε καμία ομάδα, δεν συμβαίνει το ίδιο για όγκους T3 και T4. Στους όγκους αυτούς, η υψηλή δόση LMWH και για μακρά διάρκεια χορήγησης (ομάδα IV) ήταν η μόνη, που κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα του VEGF, σε σχέση με τα επίπεδα της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα ομαλοποίησής τους, είτε με την έννοια της επαναφοράς τους στα επίπεδα των προεγχειρητικών τιμών για τους όγκους T4, είτε ακόμη και μειώνοντάς τα, για τους όγκους T3.

Επίσης, για το βαθμό λεμφαδενικής διήθησης, από τη μελέτη μας, προκύπτουν ευρήματα ανάλογα με αυτά της συσχέτισής τους με το μέγεθος του όγκου T. Ειδικά, στην ομάδα της υψηλής δόσης LMWH και μακράς διάρκειας χορήγησης, τόσο για τους όγκους N1, όσο και για τους N2, τα επίπεδα του VEGF κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με αυτά κατά την 10<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση.

Ανάλογα ευρήματα με τα παραπάνω προέκυψαν και σε σχέση με το στάδιο της νόσου. Ειδικά για τους όγκους σταδίου III, η υψηλή δόση LMWH και για μακρά διάρκεια χορήγησης (ομάδα IV) ήταν η μόνη, που κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα του VEGF, σε σχέση με τα επίπεδα της 10<sup>ης</sup> μετεγχειρητικής ημέρας.

Στην ομάδα MUC της μελέτης μας και παρά τον μικρό αριθμό των ασθενών, παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα ευρήματα, άξια σχολιασμού. Οι ασθενείς αυτοί, παρότι παρουσίασαν ανάλογο με τους ασθενείς των άλλων ομάδων πρότυπο αύξησης των επιπέδων VEGF μετεγχειρητικά, διαφέρουν σημαντικά, λόγω των πολύ υψηλών τιμών του VEGF, τόσο κατά τη 10<sup>η</sup>, όσο και κατά την 30<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα. Οι ασθενείς με βλεννώδη νεοπλάσματα είναι λιγότερο καλά μελετημένοι, σε σχέση με αυτούς με τα πλέον συχνά αδενοκαρκινώματα. Φαίνεται, πως τα νεοπλάσματα αυτά έχουν χειρότερη πρόγνωση, με χαμηλότερη 5-ετή επιβίωση, από ότι τα κλασικά αδενοκαρκινώματα, ενώ επίσης εμφανίζονται ιδιαίτερα χημειοανθεκτικά. Το 3-ετές διάστημα ελεύθερο επιβίωσης σε ασθενείς με μη βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα, είναι σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με ασθενείς που είχαν βλεννώδη ιστολογία (79.2% vs. 56.9%, αντίστοιχα).<sup>174</sup> Αντίστοιχα ευρήματα προκύπτουν και από άλλη μεγάλη μελέτη ασθενών με νόσο σταδίου I έως III.<sup>175</sup> Στα βλεννώδη νεοπλάσματα, η έκφραση της ισομορφής VEGF-165 από τον όγκο, συνδέονταν συχνότερα με μεταστατική νόσο και φτωχότερη πρόγνωση.<sup>176</sup>

Στη μελέτη μας, στους ασθενείς αυτούς το μέγεθος του όγκου (T), ο βαθμός λεμφαγγειακής διήθησης (N) και το στάδιο της νόσου, σχετίζονταν ευθέως με τα μετεγχειρητικά επίπεδα του VEGF.

## 2.6 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν, πως στην αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου:

- Τα επίπεδα του VEGF-A 165 εμφανίζουν σημαντική διακύμανση κατά την μετεγχειρητική περίοδο, η οποία μπορεί να τροποποιηθεί, μέσω της μεταβολής της δόσης και της διάρκειας χορήγησης της ηπαρίνης μικρού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιείται για την περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη,
- Η συνιστώμενη σήμερα, από πολλές επιστημονικές εταιρείες, περιεγχειρητική θρομβοπροφύλαξη με υψηλή δόση LMWH (4.500 IU), για μακρά χρονική διάρκεια (30 ημέρες), είναι αυτή που ομαλοποιεί αποτελεσματικότερα τις μετεγχειρητικές τιμές των επιπέδων του VEGF,
- Το παραπάνω αποτέλεσμα θα πρέπει να ιδωθεί υπό το πρίσμα της αδυναμίας ανάλογης παρέμβασης, με ειδικότερους αντι-VEGF παράγοντες, στο κρίσιμο αυτό διάστημα του πρώτου μετεγχειρητικού μήνα,

- Επιπλέον, το παραπάνω σχήμα, περιεγχειρητικής θρομβοπροφύλαξης φαίνεται να παρεμβαίνει ταυτόχρονα και σε διάφορες παραμέτρους του μηχανισμού πήξης/αιμόστασης, όπως στην ενεργότητα των αντιθρομβωτικών πρωτεϊνών ΑΤΙΙΙ και C και του παράγοντα VIII, με συνολικά την αποτελεσματικότερη ρύθμιση του συστήματος, ώστε να μειώνεται η πιθανή υπερπηκτικότητα, που συνήθως συνοδεύει τα κακοήθη νοσήματα.



### **3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

### 3.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΕΓΓΡΑΦΟ ΣΥΝΑΙΝΕΣΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**Υπεύθυνοι: Μιχαήλ Μήτσης, MD, PhD, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων**

**Παναγιώτης Κολιού, BS, MSc**

Τηλέφωνο Επικοινωνίας: 6973375489

Εάν επιθυμείτε, μπορείτε να επιλέξετε να συμμετάσχετε σε αυτήν την κλινική μελέτη, με τίτλο, «Το Αποτέλεσμα των Μικρού Μοριακού Βάρους Ηπαρινών, στους Βιοχημικούς Παράγοντες Αγγειογένεσης – Μια Απλή Τυχαιοποιημένη Μελέτη». Πρωταρχικός στόχος αυτής της έρευνας είναι η ανεύρεση τυχόν σχέσης μεταξύ της χρήσης μικρού μοριακού βάρους ηπαρινών και της μείωσης διαφόρων παραγόντων αγγειογένεσης σε ασθενείς με νεοπλασία. Εάν αποφασίσετε να πάρετε μέρος σε αυτήν την μελέτη θα χρειαστεί να πάρετε αντιπηκτική αγωγή για 10 ημέρες, όπως γίνεται συνήθως μετά από κάθε χειρουργική επέμβαση, ή και να συνεχίσετε αυτήν την αγωγή μέχρι 30 ημέρες. Κατά την περίοδο αυτήν θα παρακολουθείστε από την κλινική μας σε τακτά χρονικά διαστήματα και θα υποβληθείτε σε απλές εξετάσεις αίματος. Στη μελέτη αυτή προσπαθούμε να διερευνήσουμε τον ρόλο των μικρού μοριακού βάρους ηπαρινών, σε παράγοντες οι οποίοι μετρώνται στο αίμα. Οι παράγοντες που θα μετρηθούν στο αίμα, θα δούμε πως επηρεάζουν την εξέλιξη της αγγειογένεσης σε νεοπλάσματα του παχέος εντέρου, καθώς και την ποιότητα και επιμήκυνση της ζωής.

#### **Στόχος της Κλινικής Μελέτης**

Ο βασικός σκοπός της μελέτης αυτής είναι να μάθουμε κατά πόσο τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται για να σταματήσουν την πήξη του αίματος σε κάθε χειρουργική επέμβαση, μπορούν να σταματήσουν και την ανάπτυξη του καρκίνου, εάν χορηγηθούν για κάποια περίοδο μετά την εξαίρεση του. Τα μέλη αυτής της κλινικής έρευνας έχουν αποφασίσει ότι είστε σε θέση να λάβετε μέρος σε αυτήν την μελέτη.

#### **Λόγοι Δημιουργίας της Κλινικής Μελέτης**

Παραδείγματα: Υπάρχουν πολλές ασθένειες οι οποίες αναπτύσσονται καθώς αυξάνεται η ηλικία σε γυναίκες και άντρες. Τα νεοπλάσματα του παχέος εντέρου είναι συχνά και στα δύο φύλα.

#### **Τι θα Κάνετε Εσείς στην Κλινική Μελέτη;**

Εάν αποφασίσετε να πάρετε μέρος στην μελέτη αυτήν, θα παρακολουθήσετε εντατικά για περίπου 30 μέρες και αργότερα μέχρι και 2 χρόνια. Κατά την μηνιαία περίοδο παρακολούθησης, θα είμαστε σε επαφή, για τις δειγματοληψίες αίματος, καθώς και για την σωστή χορήγηση του φαρμάκου.

Την 30<sup>η</sup> μέρα της παρακολούθησης θα προσκαλείσθε στην κλινική, για γενική εξέταση αίματος και για δείγματα για τους παράγοντες αγγειογένεσης.

Κατά την εισαγωγή στο Νοσοκομείο και πριν το χειρουργείο, αφού έχετε συμφωνήσει να λάβετε μέρος, τα μέλη της κλινικής μελέτης θα:

- Καταγράψουν τα ονόματα και τις δόσεις των φαρμάκων που σας χορηγούνται και τυχόν άλλες θεραπείες, στις οποίες έχετε υποβληθεί (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία)
- Μετρήσουν την αρτηριακή πίεση, το ύψος και το βάρος σας
- Σας δώσουν ερωτηματολόγια, που θα συμπληρώσετε για εσάς και για τον τρόπο ζωής σας
- Σας υποβάλλουν σε δειγματοληψίες αίματος, για τον υπολογισμό διαφόρων παραγόντων

Τα τυχόν μη φυσιολογικά αποτελέσματα δεν θα αναφερθούν σε εσάς ή στον γιατρό σας εκτός, εάν το θελήσετε. Μερικά από τα δείγματα θα αποθηκευθούν, για όσπιμες μετρήσεις, οι οποίες θα είναι συναφείς με την ασθένεια σας. Αυτές οι εξετάσεις δεν θα επηρεάσουν τη συνηθισμένη ιατρική φροντίδα που συνήθως παρέχεται. Η μελέτη θα περιέχει την εξέταση γονιδίων και παραγόντων οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την εξέλιξη της νόσου και πιθανόν την απάντηση στα φάρμακα που θα παίρνετε.

Συναινώ στα παραπάνω \_\_\_\_\_

Δεν συναινώ στα παραπάνω \_\_\_\_\_

### **Όφελος και Κίνδυνοι**

Μπορεί να μην υπάρξει άμεσο αποτέλεσμα, λόγω της συμμετοχής σας στην μελέτη. Παίρνοντας μέρος στην έρευνα αυτή, μπορεί να βοηθήσετε, ώστε να αυξηθεί η επιστημονική γνώση, στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου.

### **Δειγματοληψία Αίματος**

Υπάρχει ελάχιστος κίνδυνος για σας κατά τη φλεβοκέντηση για λήψη αίματος, η οποία θα γίνει απαραίτητα, ακόμη και αν δεν συμμετάσχετε στη μελέτη. Μπορεί να νιώσετε λίγη δυσφορία, κατά την εισαγωγή της βελόνης στο δέρμα και μπορεί να υπάρξει μελάνιασμα της περιοχής. Πίεση στο σημείο της παρακέντησης, για 1 με 2 λεπτά μετά την έξοδο της βελόνας, θα βοηθήσει στην πρόληψη του μελανιάσματος. Δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος μόλυνσης, όμως πολύ σπάνια, μερικοί άνθρωποι εμφανίζουν ζάλη ή και λιποθυμία. Εάν αισθανθείτε κάτι τέτοιο, πείτε το στο άτομο που



κάνει την δειγματοληψία και εκείνος/η θα σας τοποθετήσει σε ύπτια θέση στο εξεταστικό κρεβάτι, μέχρι το αίσθημα δυσφορίας να υποχωρήσει.

### **Οικονομικό Κόστος**

Οι εξετάσεις και οι επισκέψεις που θα γίνουν, ως μέρος αυτής της κλινικής μελέτης θα σας κοστίσουν μόνο τον χρόνο σας για την επίσκεψη στο νοσοκομείο. Όλες οι εξετάσεις είναι μέρος της κανονικής ρουτίνας για την ασθένεια σας και καλύπτονται από το ασφαλιστικό σας ταμείο. Δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος, να αναπτύξετε κάποια άλλα προβλήματα υγείας, από τη μελέτη αυτή. Παίρνοντας μέρος στη μελέτη, δεν θα αμειψτείτε χρηματικά, αλλά θα συνεισφέρετε στη γνώση για την ασθένεια σας και μπορεί να έχετε και ευεργετικά αποτελέσματα ως προς την εξέλιξη της νόσου σας.

### **Εμπιστευτικότητα**

Όλοι οι φάκελοι των ασθενών είναι εμπιστευτικοί, όπως επιβάλλεται από το νόμο. Η προσωπική σας ταυτότητα δεν θα γίνει γνωστή, σε καμιά δημοσίευση των κλινικών εκβάσεων αυτής της μελέτης και τα αποτελέσματα δεν θα είναι ελεύθερα προς χρήση για κανέναν. Εάν κάποιο πρόβλημα υγείας παρατηρηθεί κατά την διάρκεια της εξέτασης, θα ενημερωθείτε για αυτό, και πληροφορίες θα δοθούν στο γιατρό ή την κλινική σας. Μόνο τα μέλη της κλινικής μελέτης θα γνωρίζουν και θα έχουν πρόσβαση στον ιατρικό σας φάκελο.

### **Δικαίωμα Αποχώρησης από την Έρευνα**

Η απόφαση να συμμετάσχετε σε αυτήν την μελέτη είναι **εθελοντική**. Μπορείτε να απεμπλακείτε από την μελέτη αυτήν σε κάθε χρονική στιγμή, για κάθε λόγο και χωρίς ειδοποίηση και αυτό δεν θα επηρεάσει τη συνήθη ιατρική σας φροντίδα. Εάν αποφασίσετε να αποσυρθείτε από την έρευνα, ελπίζουμε να είμαστε σε επαφή, για να ενημερωνόμαστε για την κατάσταση της ασθένειας σας. Όμως, στην περίπτωση αυτή, θα εκτιμούσαμε την πρόθεσή σας να μας ενημερώσετε. Ελπίζουμε να πάρετε μέρος στην μελέτη για όλη τη χρονική διάρκεια της.

### **Εθελοντική Συναίνεση**

Εάν έχετε ερωτήσεις για οποιοδήποτε θέμα της μελέτης αυτής, ή για τα δικαιώματά σας ως εθελοντής, κάποιο μέλος της μελέτης θα είναι έτοιμο να σας απαντήσει, πριν υπογράψετε το έγγραφο συναίνεσης. Εάν έχετε κάποιες ερωτήσεις, μπορείτε να καλέσετε τους επιστημονικούς υπεύθυνους, που αναφέρονται στην αρχή αυτού του εγγράφου. Πριν να υπογράψετε αυτό το έγγραφο, παρακαλούμε να θέσετε οποιοσδήποτε ερωτήσεις τυχόν έχετε, για ότι είναι για σας ασαφές.

### **Άλλες Πληροφορίες**

Η συμμετοχή σας σ' αυτή τη μελέτη είναι σημαντική, για την επιτυχία της. Για να συμμετάσχετε, δεν θα πρέπει να λάβετε μέρος σε άλλες επιστημονικές μελέτες, στις οποίες υπάρχει χρήση φαρμακευτικής αγωγής, ειδικής εξέτασης, ή άλλης ειδικής θεραπείας. Εάν κάποιες εξετάσεις δείξουν κάποιο πρόβλημα υγείας, που χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, θα σταλούν στο γιατρό ή την κλινική που σας παρακολουθεί, για να αξιολογηθούν. Αντίγραφα αυτών των αναφορών και ιατρικών σας δεδομένων, από τους γιατρούς που σας παρακολουθούν, μπορεί να αναζητηθούν και να συμπεριληφθούν στη μελέτη. Είτε επιλέξετε να συμμετάσχετε, είτε όχι, η παρεχόμενη ιατρική φροντίδα και η ιατρική ασφαλιστική σας κάλυψη, δεν θα επηρεαστούν. Η μελέτη δεν θα αντικαταστάσει την παρεχόμενη ιατρική φροντίδα.

Εάν δεν είστε σε θέση να συνεχίσετε το έλεγχο μετά την πάροδο των 30 ημερών, τα μέλη της Κλινικής θα επικοινωνήσουν με εσάς, ή τους στενούς σας συγγενείς, για ενημέρωση. Σε περίπτωση μετακίνησης, σας παρακαλούμε να μας ενημερώσετε, ώστε να είμαστε σε επαφή μαζί σας.

### **Κατάθεση του Ερευνητή**

Έχω δώσει μια ολοκληρωμένη περιγραφή του παραπάνω ερευνητικού προγράμματος. Ο συμμετέχων, είχε την ευκαιρία να συζητήσει τις διαδικασίες αυτές και να κάνει τυχόν επιπρόσθετες ερωτήσεις. Ένα υπογεγραμμένο αντίγραφο του εγγράφου συναίνεσης έχει δοθεί στον συμμετέχοντα/συμμετέχουσα.

---

Υπογραφή του Βασικού Ερευνητή ή Συνυπογράφοντος

/ /  
Ημερομηνία

### 3.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

#### ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

#### ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ/ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΣΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Επικυρώνω, ότι έχω διαβάσει (ή ότι μου έχουν διαβάσει), το έγγραφο συναίνεσης, για συμμετοχή στην κλινική αυτή έρευνα και ότι καταλαβαίνω την περιγραφή της. Έχω λάβει απαντήσεις σ' όλες μου τις ερωτήσεις, για τη μελέτη αυτή. Καταλαβαίνω, ότι μπορώ παραιτηθώ από τη συμμετοχή μου στην έρευνα αυτή, ανά πάσα στιγμή. Καταλαβαίνω επίσης, ότι μπορώ να θέσω περαιτέρω ερωτήσεις, ανά πάσα στιγμή και ότι θα μου παραχωρηθεί αντίγραφο αυτού του υπογεγραμμένου εγγράφου συναίνεσης, για το δικό μου αρχείο. Ακόμα δηλώνω, ότι είχα την ευκαιρία να μελετήσω διεξοδικά το «Έγγραφο Πληροφοριών για την Συναίνεση» στη μελέτη και έχω θέσει τις ερωτήσεις μου για αυτό.

---

	/ /
Υπογραφή Συμμετέχοντα/Συμμετέχουσας	Ημερομηνία

---

	/ /
Υπογραφή Μάρτυρα	Ημερομηνία

### 3.3 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Επίθετο: \_\_\_\_\_ Όνομα: \_\_\_\_\_

Ημ Γέννησης: ΗΜ / Μ / ΧΡΟΝΟΣ Φύλο (tick): Άρρεν  Θήλυ

Βάρος(Kg): \_\_\_\_\_ Ύψος(m): \_\_\_\_\_

Οικογενειακό ιστορικό Ca παχέος εντέρου: ΝΑΙ  ΟΧΙ   
(1<sup>ο</sup> βαθμού συγγενείς) : ΝΑΙ  ΟΧΙ

Κάπνισμα: Ποτέ  Καπνιστής  Πρώην

Επίπεδο Άσκησης: Σπάνια  Περιστασιακά (1-2/εβδομάδα)  Συστηματικά   
(>3/εβδομάδα)

Αλκοολούχα ποτά/μέρα:

Καφεϊνούχα ποτά/μέρα:

Διαιτητικές Συνήθειες:

Ca<sup>+2</sup> Πόσα ποτήρια γάλα καταναλώνετε ανά ημέρα;

Πόσες μερίδες τυροκομικών προϊόντων (τυριά, γιαούρτι κτλ) καταναλώνετε ανά μέρα;

Πόσες μερίδες κρέατος καταναλώνετε ανά εβδομάδα;

Φαρμακευτική Αγωγή:

#### **Συμπτώματα από το Γαστρεντερικό, που υπήρξαν πριν τη διάγνωση του νεοπλάσματος**

Αίμα στα κόπρανα: ΝΑΙ  ΟΧΙ

Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου: ΝΑΙ  ΟΧΙ

Άτυπο κοιλιακό άλγος: ΝΑΙ  ΟΧΙ

Εναλλαγές διάρροιας/δυσκοιλιότητας: ΝΑΙ  ΟΧΙ

Προηγούμενο χειρουργικό ιστορικό:



## **4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E FD. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1374-1403.
3. Center MM, Jemal A, Smith RA WE. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:366-378.
4. Garcia-Alvarez A, Serra-Majem L R-, Barba L et al. Obesity and overweight trends in Catalonia, Spain (1992-2003): gender and socio-economic determinants. *Public Heal Nutr.* 2007;10:1368-1378.
5. Martín JJD, Hernández LS, Gonzalez MG, Mendez CP, Rey Galán C, Guerrero SM. Trends in childhood and adolescent obesity prevalence in Oviedo (Asturias, Spain) 1992-2006. *Acta Paediatr.* 2008;97(7):955-958.
6. De Kok IMCM, Wong CS, Chia KS, et al. Gender differences in the trend of colorectal cancer incidence in Singapore, 1968-2002. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(5):461-467.
7. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* 2010;116(3):544-573.
8. Atkin W, Edwards R, Kralj-Hans I, et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;375(9726):1624-1633.
9. Steliarova-Foucher E, O'Callaghan M, Ferlay J, Masuyer E, Forman D, Comber H BF. European Cancer Observatory: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in Europe.
10. Ferlay J, Parkin DM S-FE. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer.* 2010;46(4):765-781.
11. Leufkens AM, van den Bosch M a a J, van Leeuwen MS, Siersema PD. Diagnostic accuracy of computed tomography for colon cancer staging: a systematic review. *Scand J Gastroenterol.* 2011;46(7-8):887-894.
12. Park J, Floch MH. Prebiotics, Probiotics, and Dietary Fiber in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007;36:47-63.
13. Weisburger JH. Lifestyle, health and disease prevention: The underlying mechanisms. *Eur J Cancer Prev.* 2002;11 (SUPPL.:S1-S7.
14. LEVIN B. NUTRITION AND COLORECTAL-CANCER. *Cancer.* 1992;70:1723-1726.
15. Stemmermann GN, Nomura AMY, Heilbrun LK. Dietary fat and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1984;44:4633-4637.
16. AH Q. Radiation-induced carcinoma of the rectum. A late complication of pelvic irradiation. *Arch Pathol.* 1974;98:118-121.
17. Black WC AL. Carcinoma of the large intestine as a late complication of pelvic radiotherapy.

*Clin Radiol.* 1965;16:278-281.

18. Schipper H, Decter A. *Carcinoma of the Colon Arising at Ureteral Implant Sites despite Early External Diversion: Pathogenetic and Clinical Implications.* *Cancer* 47, 2062-2065 (1981).
19. Rivard JY, Bedard A, Dionne L. Colonic neoplasms following ureterosigmoidostomy. *J Urol.* 1975;113:781-786.
20. Marcheggiano A, Iannoni C, Pallone F, Frieri G, Gallucci M, Caprilli R. Abnormal patterns of colonic mucin secretion after ureterosigmoidostomy. *Hum Pathol.* 1984;15:647-650.
21. Jass JR. Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology.* 1998;32:491-497.
22. Lynch HT. 030306 Hereditary Colorectal Cancer. *Color Cancer.* 2003;348:919-932.
23. Lynch HT ST. Hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol.* 1999;26:478-484.
24. Broaddus RR, Lynch PM, Lu KH, Luthra R, Michelson SJ. *Unusual Tumors Associated with the Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome.* *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17, 981-989 (2004).
25. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer.* 1993;71:677-685.
26. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 2001;158:527-535.
27. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993;363:558-561.
28. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 1993;260:812-816.
29. Boland CR. Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer.* 1996;69:47-49.
30. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993;75:1027-1038.
31. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1994;145:148-156.
32. Jass JR, Do KA, Simms LA, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut.* 1998;42:673-679.
33. Risio M, Reato G, di Celle PF, Fizzotti M, Rossini FP, Foà R. Microsatellite instability is associated with the histological features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. *Cancer Res.* 1996;56:5470-5474.
34. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1998;58:3455-3460.



35. Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6870-6875.
36. Lynch HT, Smyrk TC, Lanspa SJ, Lynch PM, Watson P, Strayhorn PC, Bronson EK, Lynch JF, Priluck IA AH. Phenotypic variation in colorectal adenoma/cancer expression in two families. Hereditary flat adenoma syndrome. *Cancer*. 1990;66:909-915.
37. Cao Y, Schlag PM, Karsten U. Immunodetection of epithelial mucin (MUC1, MUC3) and mucin-associated glycotopes (TF, Tn, and sialosyl-Tn) in benign and malignant lesions of colonic epithelium: apolar localization corresponds to malignant transformation. *Virchows Arch*. 1997;431:159-166.
38. Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, et al. Mucins in human neoplasms: clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathol Int*. 2011;61:697-716.
39. Walsh MD, Young JP, Leggett BA, Williams SH, Jass JR, McGuckin MA. The MUC13 cell surface mucin is highly expressed by human colorectal carcinomas. *Hum Pathol*. 2007;38:883-892.
40. Chesa PG, Rettig WJ, Melamed MR. Expression of cytokeratins in normal and neoplastic colonic epithelial cells. Implications for cellular differentiation and carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1986;10:829-835.
41. Berezowski K, Stastny JF, Kornstein MJ. Cytokeratins 7 and 20 and carcinoembryonic antigen in ovarian and colonic carcinoma. *Mod Pathol*. 1996;9:426-429.
42. Loy TS, Calaluce RD. Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol*. 1994;102:764-767.
43. Kende AI, Carr NJ, Sobin LH. Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the gastrointestinal tract. *Histopathology*. 2003;42:137-140.
44. Saad RS, Silverman JF, Khalifa MA, Rowsell C. CDX2, cytokeratins 7 and 20 immunoreactivity in rectal adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009;17:196-201.
45. O'Brien MJ, Zamcheck N, Burke B, Kirkham SE, Saravis CA, Gottlieb LS. Immunocytochemical localization of carcinoembryonic antigen in benign and malignant colorectal tissues. Assessment of diagnostic value. *Am J Clin Pathol*. 1981;75:283-290.
46. Goslin R, O'Brien MJ, Steele G, et al. Correlation of plasma CEA and CEA tissue staining in poorly differentiated colorectal cancer. *Am J Med*. 1981;71:246-253.
47. Pihl E, McNaughtan J, Ward HA, Nairn RC. Immunohistological patterns of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Correlation with staging and blood levels. *Pathology*. 1980;12:7-13.
48. Esteban JM, Paxton R, Mehta P, Battifora H, Shively JE. Sensitivity and specificity of gold types 1 to 5 anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies: Immunohistologic characterization in colorectal cancer and normal tissues. *Hum Pathol*. 1993;24:322-328.
49. Mazziotta RM, Borczuk AC, Powell CA, Mansukhani M. CDX2 immunostaining as a gastrointestinal marker: expression in lung carcinomas is a potential pitfall. *Appl*

*Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13:55-60.

50. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:303-310.
51. Listrom MB, Little J V, McKinley M, Fenoglio-Preiser CM. Immunoreactivity of tumor-associated glycoprotein (TAG-72) in normal, hyperplastic, and neoplastic colon. *Hum Pathol.* 1989;20:994-1000.
52. Su M-C, Yuan R-H, Lin C-Y, Jeng Y-M. Cadherin-17 is a useful diagnostic marker for adenocarcinomas of the digestive system. *Mod Pathol.* 2008;21:1379-1386.
53. Gotzos V, Wintergerst ES, Musy JP, Spichtin HP, Genton CY. Selective distribution of calretinin in adenocarcinomas of the human colon and adjacent tissues. *Am J Surg Pathol.* 1999;23:701-711.
54. Campo E, Palacin A, Benasco C, Quesada E, Cardesa A. Human chorionic gonadotropin in colorectal carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer.* 1987;59:1611-1616.
55. Watanabe H, Tokuyama H, Ohta H, Satomura Y, Okai T, Ooi A, Mai M SN. Expression of placental alkaline phosphatase in gastric and colorectal cancers. An immunohistochemical study using the prepared monoclonal antibody. *Cancer.* 1990;66:2575-2582.
56. Slattery ML, Samowitz WS, Holden JA. Estrogen and progesterone receptors in colon tumors. *Am J Clin Pathol.* 2000;113:364-368.
57. Witte D, Chirala M, Younes A, Li Y, Younes M. Estrogen receptor beta is expressed in human colorectal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2001;32:940-944.
58. Chen Z-ME, Ritter JH, Wang HL. Differential expression of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in adenocarcinomas of the small and large intestines. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:890-896.
59. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87:159-170.
60. R P. Molecular genetics and hereditary cancer: hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma as a model. *Cancer.* 1997;(80):533-536.
61. FT B. Molecular pathology of colorectal cancer. *Cytogenet Cell Genet.* 1999;(86):112-117.
62. Jothy S, Flanders TY NP. New developments in the molecular pathology of human colon cancer relevance to pathogenesis and diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 1996;(3):343-350.
63. Fearon ER VB. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61:759-767.
64. Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, et al. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: Defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol.* 2000;31:1506-1514.
65. Loukola A, Salovaara R, Kristo P, et al. Microsatellite instability in adenomas as a marker for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Pathol.* 1999;155:1849-1853.
66. Bommer GT FE. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In: Mendelsohn J,

Howley PM, Israel MA, Gray JW TC, ed. : *The Molecular Basis of Cancer*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2008:409-421.

67. Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007;50:131-150.
68. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:563-570.
69. Shia J, Ellis NA, Paty PB, et al. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1407-1417.
70. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1393-1406.
71. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer*. 1993;71:3827-3838.
72. Meyers FJ, Gumerlock PH, Kokoris SP, deVere White RW, McCormick F. Human bladder and colon carcinomas contain activated ras p21. Specific detection of twelfth codon mutants. *Cancer*. 1989;63:2177-2181.
73. Plesec TP, Hunt JL. KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol*. 2009;16:196-203.
74. Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10356-10361.
75. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*. 2000;2:653-660.
76. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:2449-2460.
77. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7555-7559.
78. Hanski C, Bornhoeft G, Shimoda T, et al. Expression of p53 protein in invasive colorectal carcinomas of different histologic types. *Cancer*. 1992;70:2772-2777.
79. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wylie AH BC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol*. 1991;(138):807-813.
80. Connelly JH, Bruner JM, Robey-Cafferty SS, Sahin A. p53 protein expression in transitional mucosa and adenocarcinomas of the colorectum. *Mod Pathol*. 1992;5:537-539.
81. Cappell MS. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37:1-24.
82. ML C, ed. Carcinoma of the Colon. In: *Colon and Rectal Surgery*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005:767-793.

83. Weese JL, O'Grady MG, Ottery FD. How long is the five centimeter margin? *Surg Gynecol Obstet.* 1986;163:101-103.
84. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:979-994.
85. Cassidy Jim, Bisset Donald RASO. Colorectal Cancer. In: *The Oxford Handbook of Oncology.* New York: Oxford University Press; 2002.
86. Porschen R, Bermann A, Löffler T, et al. *Fluorouracil plus Leucovorin as Effective Adjuvant Chemotherapy in Curatively Resected Stage III Colon Cancer: Results of the Trial adjCCA-01.* Vol 19.; 2001.
87. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:3408-3419.
88. O'Connor ES, Greenblatt DY, Loconte NK, et al. Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer With Poor Prognostic Features. *J Clin Oncol.* 2011;29:3381-3388.
89. Fenoglio-Preiser, Cecilia M. Noffsinger, Amy E. Stemmermann, Grant N. Lantz, Patrick E. Isaacson PG. Epithelial Neoplasms of the Colon. In: *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
90. Kotanagi H, Fukuoka T, Shibata Y, et al. The size of regional lymph nodes does not correlate with the presence or absence of metastasis in lymph nodes in rectal cancer. *J Surg Oncol.* 1993;54:252-254.
91. Andreola S, Leo E, Belli F, et al. Manual dissection of adenocarcinoma of the lower third of the rectum specimens for detection of lymph node metastases smaller than 5 mm. *Cancer.* 1996;77:607-612.
92. Jass JR, Miller K, Northover JM. *Fat Clearance Method versus Manual Dissection of Lymph Nodes in Specimens of Rectal Cancer.* Vol 1.; 1986.
93. Riddell RH. Recommendations for the Reporting of Resected Large Intestinal Carcinomas. *Pathol Case Rev.* 1998;3:217-222.
94. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17:1471-1474.
95. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;237:97-132.
96. Rafii S, Meeus S, Dias S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13:61-67.
97. Buschmann I, Heil M, Jost M, Schaper W. Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation.* 2003;10:371-379.
98. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:251-275.

99. Secomb TW, Konerding MA, West CA, Su M, Young AJ, Mentzer SJ. Microangiectasias: structural regulators of lymphocyte transmigration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7231-7234.
100. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 1999;77:527-543.
101. HH M. Vascular Endothelial Growth factor. *Adv Exp Med Biol*. 2002;(513):375-394.
102. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001;26:25-35.
103. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*. 1993;4:1317-1326.
104. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res*. 2004;94:664-670.
105. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7:575-583.
106. Folkman J DPB vessel formation: what is its molecular basis? C 1996; 87: 1153–5. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*. 1996;87:1153-1155.
107. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-248.
108. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*. 1998;77:956-964.
109. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-676.
110. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996;383:73-75.
111. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20:4368-4380.
112. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS FN. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362(6423):841-844.
113. Senger D, Galli S, Dvorak A, Perruzzi C, Harvey V, Dvorak H. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (80- )*. 1983;219:983-985.
114. Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM, Harvey VS, McDonagh J. Regulation of extravascular coagulation by microvascular permeability. *Science*. 1985;227:1059-1061.

115. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 1997;79:233-269.
116. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 2002;29:10-14.
117. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev*. 2002;16:2684-2698.
118. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*. 1990;50:1774-1778.
119. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol*. 2000;20:7282-7291.
120. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998;92:735-745.
121. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111:649-658.
122. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*. 1990;172:1535-1545.
123. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*. 2003;28:488-494.
124. Sun JF, Phung T, Shiojima I, et al. Microvascular patterning is controlled by fine-tuning the Akt signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:128-133.
125. Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem*. 2003;278:48848-48860.
126. Dvorak HF RF. Basic hemostasis and thrombosis in cancer. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW GJ, ed. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
127. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*. 2003;124:58S - 68S.
128. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*. 1996;88:1583-1587.
129. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30:5-20.
130. Koh MY, Powis G. Passing the baton: The HIF switch. *Trends Biochem Sci*. 2012;37:364-

372.

131. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T KR. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):3609-3614.
132. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD PR. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;53:245-282.
133. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30:63-69.
134. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science (80- )*. 1999;285:1028-1032.
135. Chan B, Merchan JR, Kale S, Sukhatme VP. Antiangiogenic property of human thrombin. *Microvasc Res*. 2003;66:1-14.
136. Oh C-W, Hoover-Plow J, Plow EF. The role of plasminogen in angiogenesis in vivo. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1683-1687.
137. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem*. 2000;275:1521-1524.
138. Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:663-668.
139. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*. 1995;55:5687-5692.
140. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 1999;5:487-491.
141. Arisato T, Hashiguchi T, Sarker KP, et al. Highly accumulated platelet vascular endothelial growth factor in coagulant thrombotic region. *J Thromb Haemost*. 2003;1:2589-2593.
142. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*. 1997;386:616-619.
143. Martini F, Riondino S, Basili S, Bertazzoni G FP. In vivo platelet activation is associated with increased plasma levels of vascular endothelial growth factor. *J Thromb Haemost*. 2003;(4):853-854.
144. Lee AY. Epidemiology and management of venous thromboembolism in patients with cancer. *Thromb Res*. 2003;110:167-172.
145. Lee AYY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: Risks and outcomes. *Circulation*. 2003;107.
146. Alikhan R, Cohen AT, Combe S, et al. *Prevention of Venous Thromboembolism in Medical Patients with Enoxaparin: A Subgroup Analysis of the MEDENOX Study*. Vol 14.; 2003.

147. Klerk CPW, Smorenburg SM, Büller HR. Thrombosis prophylaxis in patient populations with a central venous catheter: a systematic review. *Arch Intern Med.* 2003;163:1913-1921.
148. Di Nisio M, Squizzato A, Klerk CPW, Richel DJ, Büller HR. Antithrombotic therapy and cancer. *Curr Opin Hematol.* 2004;11:187-191.
149. A T. Plegmasia alba dolens. *Clin Med Deliv Hotel Paris.* 1865;5:281-332.
150. Levitan N, Dowlati A, Remick SC, et al. Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. *Medicine (Baltimore).* 1999;78:285-291.
151. Lazo-Langner A, Goss GD, Spaans JN, Rodger MA. The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost.* 2007;5:729-737.
152. Siragusa S, Cosmi B, Piovella F, Hirsh J, Ginsberg JS. Low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: Results of a meta-analysis. *Am J Med.* 1996;100:269-277.
153. Pross M, Lippert H, Nestler G, et al. Effect of low molecular weight heparin on intra-abdominal metastasis in a laparoscopic experimental study. *Int J Color Dis.* 2004;19:143-146.
154. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 2003;112:853-862.
155. Ricard-Blum S, Féraud O, Lortat-Jacob H, et al. Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations. *J Biol Chem.* 2004;279:2927-2936.
156. Khorana AA, Sahni A, Altland OD, Francis CW. Heparin Inhibition of Endothelial Cell Proliferation and Organization is Dependent on Molecular Weight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2110-2115.
157. Lee AYY, Levine MN, Baker RI, et al. *Low-Molecular-Weight Heparin versus a Coumarin for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism in Patients with Cancer.* Vol 349.; 2003.
158. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, et al. *Low Molecular Weight Heparin, Therapy with Dalteparin, and Survival in Advanced Cancer: The Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study (FAMOUS).* Vol 22.; 2004.
159. Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol.* 2005;23:2130-2135.
160. Wojtukiewicz MZ, Kozlowski L, Ostrowska K, Dmitruk A ZL. Low molecular weight heparin treatment for malignant melanoma: a pilot clinical trial. *Thromb Haemost.* 2003;89(2):405-407.
161. Hormbrey E, Han C, Roberts A, McGrouther DA, Harris AL. The Relationship of Human Wound Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) After Breast Cancer Surgery to Circulating VEGF and Angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2003;9(12):4332-4339.



162. Slichter SJ, Funk DD, Leandroer LE HL. Kinetic evaluation of haemostasis during surgery and wound healing. 1974;(27):115-125.
163. P. Koliou, M. Mitsis, N. Kolaitis, Ch. Batsis, T. Messinis, M. Saranti, G. Vartholomatos MF. Hypercoagulation in colon and breast cancer patients undergoing surgery as revealed by increased platelet function. *Thromb Res*. 2010;125(S2):s174.
164. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79(2):315-328.
165. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;88(2):277-285.
166. Kondo Y, Aii S, Mori A, Furutani M, Chiba T, Imamura M. Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):622-630.
167. Ferroni P, Palmirota R, Spila A, et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and vascular endothelial growth factor tumor tissue content in colorectal cancer. *Oncology*. 2006;71(3-4):176-184.
168. Hu WG, Li JW, Feng B, Beveridge M, Yue F, Lu AG, Ma JJ, Wang ML, Guo Y, Jin XL ZM. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *Eur Surg Res*. 2007;39(4):229-238.
169. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer*. 2006;94(12):1823-1832.
170. Skipper D, Jeffrey MJ, Cooper AJ, Taylor I, Alexander P. Preferential growth of bloodborne cancer cells in colonic anastomoses. *Br J Cancer*. 1988;57(6):564-568.
171. Whalen GF, Ingber DE. Inhibition of tumor-cell attachment to extracellular matrix as a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound. *Ann Surg*. 1989;210(6):758-764.
172. Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*. 2013;122(10):1712-1723.
173. Bleeker WA, Hayes VM, Karrenbeld A, et al. Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(10):2953-2957.
174. Kim SH, Shin SJ, Lee KY, et al. Prognostic value of mucinous histology depends on microsatellite instability status in patients with stage III colon cancer treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy: a retrospective cohort study. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(11):3407-3413.
175. Park JS, Huh JW, Park YA, et al. Prognostic comparison between mucinous and nonmucinous adenocarcinoma in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(15):e658.
176. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon

cancer. *Br J Cancer*. 1998;77(6):998-1002.