



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA (MMR) ΣΕ ΚΑΛΟΗΘΗ
ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**ΜΑΡΙΑ Γ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA (MMR) ΣΕ ΚΑΛΟΗΘΗ
ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**ΜΑΡΙΑ Γ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος) »

Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπαγεωργίου Μαρίας: 24-7-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 653^α/3-2-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Φατούρος Μιχαήλ Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων

Μπατιστάτου Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 22-4-2009

«Μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) σε καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα του παχέος εντέρου. Συσχέτιση με άλλους προγνωστικούς δείκτες».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 759^α/14-2-2014

1. Βουγιουκλάκης Θεόδωρος Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Λεβειδιώτου –Στεφάνου Σταματίνα Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Φατούρος Μιχαήλ Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γούσια Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-4-2014

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Φωτόπουλος Ανδρέας

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής



Θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον επιβλέποντα της διατριβής Καθηγητή, κ. Δημήτριο Στεφάνου για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγηση και την εξαιρετική συμπαράσταση του σε όλα τα στάδια κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Άννα Μπατιστάτου, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για τον πολύ από τον πολύτιμο χρόνο της που μου αφιέρωσε για να πραγματοποιηθεί η μελέτη των δειγμάτων, η εξαγωγή των αποτελεσμάτων καθώς και για τις υποδείξεις της σχετικά με τη βιβλιογραφία.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Μιχαήλ Φατούρο, Ομότιμο Καθηγητή Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Θεόδωρο Βουγιουκλάκη, Καθηγητή Ιατροδικαστικής - Τοξικολογίας, την κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, την κ. Άννα Γούσια, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και την κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας οι οποίοι διετέλεσαν μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου.

Ευχαριστώ επίσης όλο το προσωπικό και τους ειδικευόμενους ιατρούς του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για τη βοήθεια τους σε ότι χρειάστηκα καθόλο το διάστημα περάτωσης της διατριβής.

Τέλος δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τον αδελφό μου και το Δημήτρη για τη συμπαράστασή τους από την αρχή έως και τέλος της εργασίας αυτής.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα καλοήθη επιθηλιακά νεοπλάσματα (πολύποδες) και το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου αποτελούν δυο συχνές παθήσεις του παχέος εντέρου. Οι πολύποδες του παχέος εντέρου διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους μη νεοπλασματικούς και τους νεοπλασματικούς. Η ιδιαίτερη σημασία τους είναι λόγω της αυξημένης συχνότητας τους και εμφάνισης στο παχύ έντερο. Επίσης μπορούν να εξαλλαγούν σε αδενοκαρκίνωμα ή ακόμα και να συνυπάρχουν με ένα. Οι πολύποδες μπορεί να είναι μονήρεις ή πολλαπλοί και απαντώνται και στα δυο φύλα ηλικίας άνω των 50 ετών και ανευρίσκονται στο 30% έως 50% του πληθυσμού. Σε ηλικία άνω των 60 ετών παρατηρούνται στο 60% των ατόμων. Οι μισοί από αυτούς εντοπίζονται στο σιγμοειδές ή το ορθό και προέρχονται από το επιθήλιο που επενδύει το κόλον.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μείζον ιατροκοινωνικό πρόβλημα λόγω της υψηλής του συχνότητας και της σημαντικής θνησιμότητας. Αποτελεί την πιο συχνή πάθηση του πεπτικού συστήματος και έρχεται δεύτερη σε συχνότητα και θνησιμότητα μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και του ορθού προσβάλλει και τα δυο φύλα, στις γυναίκες όμως είναι συχνότερος ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ιδίως του δεξιού κόλου, ενώ στους άνδρες ο καρκίνος του ορθού. Το αδένωμα (αδενωματώδης πολύποδας) θεωρείται η πρόδρομος βλάβη του αδενοκαρκινώματος. Η παθογένεση του έχει διερευνηθεί ενδελεχώς τα τελευταία χρόνια λόγω της συχνότητας του αλλά και της σχετικά εύκολης προσέγγισής του με το ενδοσκόπιο. Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου εξελίσσεται μέσα από μια αλληλουχία διακριτών μορφολογικά αλλοιώσεων από το φυσιολογικό επιθήλιο, στην επιθηλιακή υπερπλασία, στο σχηματισμό αδενώματος που σταδιακά μεγαλώνει και τελικά παθαίνει κακοήθη εξαλλαγή. Το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου εμφανίζει μεγάλες διαφορές στο βαθμό διαφοροποίησεως των καρκινικών κυττάρων.

Ο πιο σημαντικός προγνωστικός δείκτης είναι η τοπική έκταση και η διασπορά του νεοπλάσματος τη στιγμή της διάγνωσης. Η κατανόηση της μοριακής βάσης του καρκίνου του παχέος εντέρου αποτελεί σημείο κλειδί στην αντιμετώπιση της θεραπείας του ασθενούς. Χρωμοσωμική αστάθεια ανιχνεύεται περίπου στο 80% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου και συνοδεύεται από απώλεια ετεροζυγωτίας κάποιων σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων των οποίων η

δράση είναι να αντιλαμβάνονται και να καταστρέφουν τον κακοήθη φαινότυπο και να διατηρούν τη χρωμοσωμική σταθερότητα κατά την αντιγραφή του DNA.

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) είναι ένα γενετικό ελάττωμα που προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA αποτελούν ουσιαστικά το διορθωτικό μηχανισμό της αντιγραφής του DNA. Πολλές φορές υπάρχουν λάθη κατά την αντιγραφή που ξεφεύγουν από το μηχανισμό του MMR και οδηγούν σε αυξημένη συχνότητα καρκίνου. Έτσι μπορεί να μην εκφραστεί καθόλου μια πρωτεΐνη και να υπάρχει απώλεια της ή να εντοπιστεί μείωση της λειτουργικότητάς της. Επιτακτική ανάγκη αποτελεί η χρήση της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση των λαθών του συστήματος MMR γιατί αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την εντόπιση παθογόνου μετάλλαξης στα γονίδια επιδιόρθωσης και την εντόπιση ασθενών στους οποίους εμφανίζεται η διαταραχή αυτή.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA μπορούν να συμβάλλουν στην αναζήτηση εναλλακτικών φαρμακευτικών θεραπευτικών σχημάτων για την καλύτερη αντιμετώπιση του ασθενούς.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα και παρατηρήθηκαν οι αλλαγές της έκφρασης τους στην αλληλουχία φυσιολογικός ιστός – υπερπλαστικοί πολύποδες – αδενώματα – αδenoκαρκινώματα. Υπήρξε ένας μεγάλος αριθμός κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων που μελετήθηκαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	9
• Ανάπτυξη	9
• Ανατομική δομή.....	10
• Ιστολογία	12
2. ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	14
2.1 Όγκοι παχέος εντέρου	14
2.1.1 Μη νεοπλασματικοί πολύποδες	14
2.1.2 Νεοπλασματικές επιθηλιακές βλάβες.....	16
2.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου	19
• Επιδημιολογία.....	19
• Εντόπιση	21
• Αιτιολογικοί Παράγοντες.....	22
1. Γενετικοί Παράγοντες και οικογενειακό ιστορικό.....	22
2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	27
3. Συνθήκες εργασίας και καρκίνος του παχέος εντέρου.....	33
• Διάγνωση	34
• Ιστολογικός τύπος.....	38
• Μετάσταση και οδοί επέκτασης.....	39
• Συμπτωματολογία.....	41
• Θεραπεία.....	42
• Πρόγνωση	44
• Σταδιοποίηση	45

3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	51
Γενετικές μεταβολές στον καρκίνο του παχέος εντέρου - Γενετική Αστάθεια	51
3.1 Χρωμοσωμική Αστάθεια.....	51
3.2 Ελαττώματα στην επιδιόρθωση του DNA – Το σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA	52
3.3 Παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA	55
3.4 Μικροδορυφόροι – Μικροδορυφορική αστάθεια	56
3.5 Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων από μεταλλάξεις.....	57
3.6 Ενεργοποίηση ογκογονιδίων που επιταχύνουν την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου.....	62
3.7 Παράγοντες αύξησης	64
3.8 Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο	66
3.9 Βλαστικά κύτταρα και καρκίνος.....	67
3.10 Γουανιλινική κυκλάση	67
4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ.....	69
5. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	71
5.1 Χρωμοσωμική εντόπιση MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.....	72
5.2 Μικροδορυφορική αστάθεια και γονίδια επιδιόρθωσης.....	75

ΣΚΟΠΟΣ.....	79
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	81
1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	83
1.1 Επιλογή δείγματος	83
1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα – Ασθενείς	85
1.3 Περιγραφή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας	87
1.4 Μέθοδος αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων	89
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	91
2.1 Υπερπλαστικοί πολύποδες του παχέος εντέρου.....	91
2.2 Αδενωματώδεις πολύποδες του παχέος εντέρου	94
2.3 Αδενοκαρκίνωμα επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα	97
2.4 Αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου.....	100
2.5 Συνδυαστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανά δείκτη	106
1. MLH1	106
2. MSH2	106
3. MSH6	107
4. PMS2	107
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	109
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	125
ABSTRACT.....	129
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ.

Ανάπτυξη

Το πρωτόγονο ή αλλιώς αρχέγονο έντερο σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας της κύησης από το τμήμα του λεκιθικού ασκού που ενσωματώνεται στο έμβρυο. Χωρίζεται σε τρία μέρη, το πρόσθιο, το μέσο και το οπίσθιο. Το ενδόδερμα του αρχέγονου/πρωτόγονου εντέρου παράγει την επιθηλιακή επένδυση για το μεγαλύτερο μέρος της πεπτικής οδού και των χοληφόρων οδών. Από το οπίσθιο έντερο αναπτύσσεται το περιφερικό παχύ έντερο. [1]

Κατά τη διάρκεια της έκτης εβδομάδας της κύησης, το μέσο και το οπίσθιο έντερο παράγουν τον ειλεό, το τυφλό, τη σκωληκοειδή απόφυση, το ανιόν κόλον, το εγκάρσιον κόλον, το κατιόν κόλον, το σιγμοειδές κόλον, το ορθό όπως επίσης και το ανώτερο τμήμα του πρωκτικού σωλήνα. Στις πρώτες εβδομάδες το ορθό και το ανώτερο τμήμα του πρωκτικού σωλήνα διαχωρίζονται από το περιβάλλον με τον πρωκτικό υμένα, ο οποίος υπό φυσιολογικές συνθήκες στα τέλη της όγδοης εβδομάδας θα υποστεί ρήξη και θα εξαφανιστεί. Πριν τη θραύση του πρωκτικού υμένα στην έξω επιφάνεια του αναπτύσσονται τα πρωκτικά επάρματα και ανάμεσά τους στο εξώδερμα δημιουργείται μια εισολκή η οποία ονομάζεται πρωκτικό βοθρίο και αντιστοιχεί στην έξω επιφάνεια του πρωκτικού υμένα. Έπειτα από τη θραύση του πρωκτικού υμένα το έντερο αρχίζει να περιελίσσεται με αποτέλεσμα την προς τα έξω επικοινωνία του οπισθίου εντέρου και το σχηματισμό του περιπρωκτικού χώρου. Ο ορθοπρωκτικός χώρος αποφράσσεται, ενώ παραμένει ο περιπρωκτικός χώρος. [1,2]

Κατά τον 8^ο μήνα τα έντερα του εμβρύου αποτελούνται από μια καστανο-πρασινωπή ύλη, το μηκόνιο. Το μηκόνιο αποτελείται από χολή και εντερικά κύτταρα και από εκεί θα είναι η πρώτη απόδευση του εμβρύου όταν γεννηθεί. Στη διάρκεια των επόμενων 2 εβδομάδων το μέσο έντερο περιστρέφεται κατά 270^ο προτού πάρει την τελική ανατομική του θέση μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Το παχύ έντερο του εμβρύου είναι στείρο μικροβίων και η βακτηριδιακή χλωρίδα (περίπου 400–500 διαφορετικά είδη μικροβίων) του εντερικού συστήματος εγκαθίσταται αμέσως μετά τη γέννηση.

Ανατομική δομή παχέος εντέρου

Το παχύ έντερο αποτελεί τη συνέχεια του λεπτού εντέρου και εκτείνεται από το τέλος του ειλεού έως τον πρωκτό με συνολικό μήκος 1,5 μέτρο περίπου. Τα μέρη από τα οποία αποτελείται το παχύ έντερο είναι τα ακόλουθα : το τυφλό, το ανιόν κόλον, το εγκάρσιο κόλον, το κατιόν κόλον, το σιγμοειδές κόλον και το ορθό (Εικόνα 1).

Το τυφλό είναι η πρώτη μοίρα του παχέος εντέρου και εντοπίζεται στο δεξιό κάτω τεταρτημόριο της κοιλίας και αποτελεί τυφλό θύλακο μήκους 5-7 εκ με χωρητικότητά του 100 – 150 cm³. Στο ανώτερο τμήμα του εκβάλλει ο ειλεός, ενώ στο έσω τοίχωμά του, η σκωληκοειδής απόφυση. Συνήθως το τυφλό περιβάλλεται από περιτόναιο και στερείται μεσεντερίου. Η σκωληκοειδής απόφυση αποτελεί σωληνώδες όργανο με ποικίλο μήκος και εκβάλλει στο τυφλό 2,5 εκ. περίπου κάτω από την ειλεοτυφλική συμβολή. [3,4]

Το ανιόν κόλον μπορεί να κυμανθεί σε μήκος από 12 έως 20 εκ. Ανέρχεται στη δεξιά πλευρά της κοιλιακής κοιλότητας από το τυφλό προς το δεξιό λοβό του ήπατος, οπού στρέφεται προς τα αριστερά σχηματίζοντας τη δεξιά κολική καμπή. Συνήθως στερείται μεσεντερίου και βρίσκεται σε οπισθοπεριτοναϊκή θέση κατά μήκος της δεξιάς πλευράς του οπίσθιου κοιλιακού τοιχώματος. [4]

Το εγκάρσιο κόλον διασχίζει την κοιλία από τη δεξιά κολική καμπή μέχρι την αριστερή και κάμπτεται προς τα κάτω για να αποτελέσει το κατιόν κόλον το οποίο με μήκος 45 εκ. αποτελεί το μακρύτερο και πλέον ευκίνητο τμήμα του παχέος εντέρου. Λόγω της πλήρους κινητικότητας του δεν παρουσιάζει σταθερή εντόπιση. Μπορεί να εντοπισθεί από το ύψος του διαπυλωρικού επιπέδου ή να εκτείνεται προς τα κάτω μέχρι και το χείλος της πυέλου. Το εγκάρσιον κόλον φέρει μεσεντέριο, το οποίο λέγεται εγκάρσιο μεσόκολο.

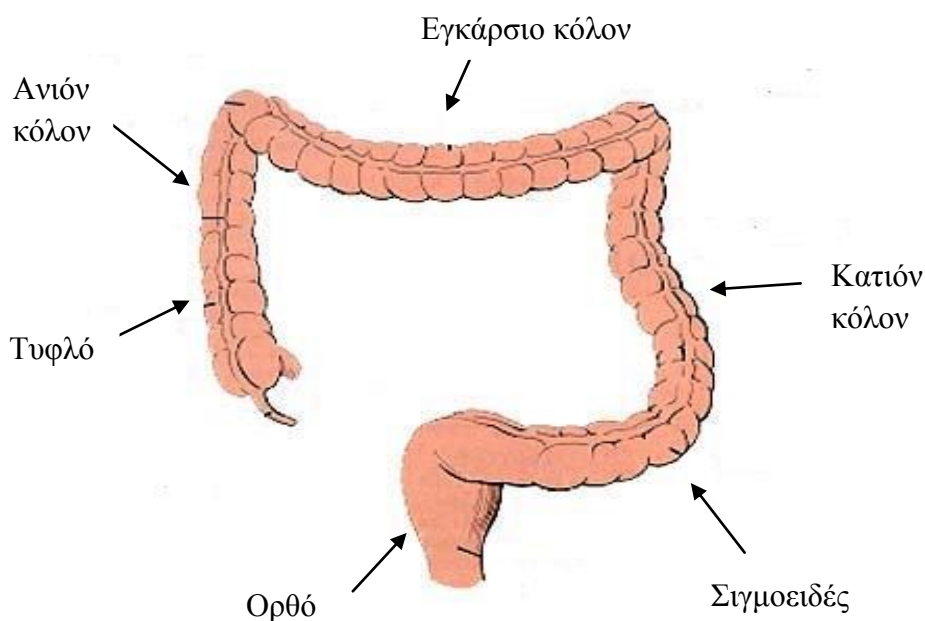
Το κατιόν κόλον κατέρχεται από την αριστερή κολική καμπή στον αριστερό λαγόνιο βόθρο οπού μεταπίπτει στο σιγμοειδές κόλον. Έχει μήκος 22-30 εκ. Συνήθως στερείται μεσεντερίου και βρίσκεται σε οπισθοπεριτοναϊκή θέση κατά μήκος της αριστερής πλευράς του οπίσθιου κοιλιακού τοιχώματος. Η οπίσθια επιφάνεια του προσφύεται στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Το κατιόν κόλον, όπως και το ανιόν, μπορεί να κινητοποιηθεί με χειρουργικούς χειρισμούς.

Το σιγμοειδές κόλον (πυελικό κόλον) παρεμβάλλεται μεταξύ του κατιόντος κόλου και του ορθού και το μήκος του είναι 40 εκ. περίπου ενώ αναφέρονται περιπτώσεις που το μήκος φτάνει και τα 80cm. Εκτείνεται από το χείλος της πυέλου μέχρι τον τρίτο σπόνδυλο του ιερού οστού όπου και μεταπίπτει το ορθό. Συνήθως φέρει επίμηκες μεσεντέριο (το μεσοσιγμοειδές) και γι' αυτό το λόγο παρουσιάζει σημαντική ελευθερία κινήσεων. Το σχήμα και η θέση του σιγμοειδούς κόλου εξαρτάται από το πόσο πλήρες είναι με κυριότερο χαρακτηριστικό του τις διάφορες παραλλαγές στη μορφή του. Τα κόπρανα αποθηκεύονται στο σιγμοειδές μέχρι λίγο πριν την αφόδευση.

Το ορθό ή απευθυσμένο ή ευθύ αποτελεί το καθηλωμένο τελικό τμήμα του παχέος εντέρου και παρά το όνομά του δεν είναι ευθύ, αλλά εμφανίζει τρεις καμπές καθώς ακολουθεί την καμπύλη του ιερού οστού και του κόκκυγα. Έχει μήκος 12cm περίπου και διάμετρο 4cm. Η τελική του μοίρα κάμπτεται απότομα προς τα πίσω και μεταπίπτει στον πρωκτικό σωλήνα. Το ορθό βρίσκεται πίσω από τον προστάτη στους άνδρες και πίσω από τον κόλπο στις γυναίκες. Καλύπτεται εν μέρει μόνο από περιτόναιο και στερείται μεσεντερίου. [4,5]

Το ορθό παροχετεύεται στους λεμφαδένες της κάτω μεσεντέριας αρτηρίας, στην άνω αιμορροϊδική αλυσίδα και στους υπογάστριους και κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες.

Εικόνα 1. Ανατομία παχέος εντέρου



Ιστολογία - Φυσιολογία

Οι κύριες λειτουργίες του παχέος εντέρου είναι δύο.

1. Η ανάκτηση του νερού από το υδαρές υπόλειμμα του περιεχομένου του λεπτού εντέρου που μεταφέρεται στο παχύ έντερο και
2. η προώθηση των σταδιακά πιο στερεών κοπράνων προς το ορθό. [4]

Εξωτερικά το παχύ έντερο χαρακτηρίζεται από τις επιμήκεις μυϊκές κολικές ίνες και τις κολικές κυψέλες.

Το τοίχωμα του παχέος εντέρου αποτελείται από τέσσερις χιτώνες –στιβάδες (ξεκινώντας από εσωτερικά προς τα έξω) :

1. το βλεννογόνο,
2. τον υποβλεννογόνιο,
3. το μυϊκό και
4. τον ορογόνο (στην περιοχή του πρωκτού αντικαθίσταται από περιμυϊκούς ιστούς).

Ο βλεννογόνος αποτελείται από το επιθήλιο (κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα), το χόριο και τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα. Το επιθήλιο του παχέος εντέρου είναι μονόστιβο κυλινδρικό και καταδύομενο σχηματίζει τις κρύπτες, που αντιστοιχούν σε ευθεία, απλά σωληνώδη αδένια. Αυτά διατάσσονται πυκνά μεταξύ τους και εκτείνονται μέχρι τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα.[4,7]

Ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου σχηματίζεται από μια κυκλοτερή εσωτερική στοιβάδα και από μια εξωτερική επιμήκη στιβάδα. Η εσωτερική επένδυση του βλεννογόνιου μυϊκού χιτώνα διακρίνεται από το μονόστιβο χαμηλό κυβικό ή κυλινδρικό επιθήλιο μέσα στο οποίο ανοίγουν οι κρύπτες Lieberkühn. Αποτελείται από τρεις τύπους κυττάρων, τα καλυκοειδή ή λαγηνοειδή κύτταρα με τα μεγάλα κενοτόπια βλέννης, τα υψηλά κυλινδρικά (απορροφητικά) κύτταρα με την ψηκτροειδή παρυφή από μικροθηλές και τα ενδοκρινικά κύτταρα. Επίσης εντοπίζονται και λίγα κύτταρα Paneth μόνο στο τυφλό και το ανιόν κόλον. Τα κύτταρα αυτά διατάσσονται σε πυκνά τοποθετημένους ευθείς σωληνοειδείς αδένες. Η διάταξη αυτή αυξάνει σημαντικά τη λειτουργική επιφάνεια του εντέρου. Ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου σχηματίζει επιμήκεις πτυχές που είναι γνωστές ως

στήλες Morgagni. Χαρακτηριστικό του παχέος εντέρου είναι η εμφανής βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα (ΒΜΣ) η οποία αποτρέπει την πήξη του περιεχομένου των αδένων του οργάνου και διευκολύνει την αποβολή της βλέννης. [4,6]

Στο υποβλεννογόνιο εμπεριέχεται το πλέγμα του Meissner, ενώ στον μυϊκό χιτώνα το πλέγμα του Auerbach. Στο μυϊκό χιτώνα αναγνωρίζονται και δύο μυϊκά πλέγματα που τον περιβάλλουν, το κυκλωτερές (που τοποθετείται εσωτερικά) και το επίμηκες (που τοποθετείται εξωτερικά). Ο μυϊκός χιτώνας εμφανίζει διαφορές στη δομή του ανάλογα με το επίπεδο στον πρωκτικό σωλήνα και μέχρι το ύψος των πρωκτικών στύλων διακατέχεται από την ίδια μορφολογία με το ανώτερο ορθό. [6]

Το χόριο αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό με τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα και ποικίλο φλεγμονώδες διήθημα που συνίσταται κυρίως από λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, ιστιοκύτταρα, και μαστοκύτταρα. Ο ορογόνος αποτελείται από ένα στοίχο αποπλατυσμένων μεσοθηλιακών κυττάρων αποτελώντας το σπλαγγικό περιτόναιο. Ο ορογόνος χιτώνας αφήνει ακάλυπτα τα οπίσθια τμήματα του ανιόντος και του κατιόντος. και καλύπτει πλήρως τη σκωληκοειδή απόφυση, το τυφλό, το εγκάρσιο και το σιγμοειδές κόλον. [6,14]

Το επιθήλιο του παχέος εντέρου ανανεώνεται διαρκώς και τα κύτταρα αντικαθίστανται από άλλα τα οποία βρίσκονται στη βάση των αδένων. [6]

Η ιστολογική δομή του εγγύς τμήματος του ορθού δεν διαφέρει από αυτή των άλλων τμημάτων του παχέος εντέρου, πέραν μιας μόνο διαφοράς, της παρουσίας των βαλβίδων του Houston.

Τα κόπρανα κατά τη διόδό τους από το παχύ έντερο σταδιακά αφυδατώνονται με αποτέλεσμα η βλέννη που εκκρίνεται από το βλεννογόνο του παχέος εντέρου να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την προστασία του ιδίου από διάφορους τραυματισμούς (ελαφρύς ή και σοβαρούς). Για την προστασία του παχέος εντέρου από την εισβολή διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, το τοίχωμα του παχέος εντέρου φέρει πολυάριθμα λευκοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και λεμφοκυττάρων. Περίπου 400–500 διαφορετικά είδη μικροβίων συνιστούν τη χλωρίδα του εντερικού συστήματος. Έτσι ο οργανισμός δημιουργεί μια φυσική ασπίδα προστασίας. [6,7,14]

2. ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

2.1 Όγκοι παχέος εντέρου

Πολύποδες

Ο όρος πολύποδας είναι κλινικός και αναφέρεται σε κάθε μόρφωμα (μια μάζα βλεννογόνου) που προβάλλει στον αυλό του εντέρου. Τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του αφορούν το μέγεθος, τη συνοδεία ή όχι μίσχου-λεπτού ή πλατύ-και τον αριθμό τους. Ανεξαρτήτως της μακροσκοπικής τους εμφάνισης, ο καθορισμός τους βασίζεται στα ιστολογικά τους ευρήματα. [15] Διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: μη νεοπλασματικοί και νεοπλασματικοί. Η ιδιαίτερη σημασία τους είναι λόγω της αυξημένης συχνότητας τους και εμφάνισης στο παχύ έντερο. Επίσης μπορούν να εξαλλαγούν σε αδenoκαρκίνωμα ή ακόμα και να συνυπάρχουν με ένα. Οι πολύποδες μπορεί να είναι μονήρεις ή πολλαπλοί. [12,14,16]

2.1.1 Μη νεοπλασματικοί πολύποδες

Υπερπλαστικοί πολύποδες

Οι υπερπλαστικοί πολύποδες αποτελούν μικρές πολλαπλές προεκβολές του βλεννογόνου του παχέος εντέρου. Ανευρίσκονται στο 50% των ενηλίκων. Εντοπίζονται συνηθέστερα στο ορθό και στο αριστερό κόλο. Είναι επίπεδοι, άμισχοι, σχετικά μικροί και το χρώμα τους αρκετά ανοιχτό. Είναι ασυμπτωματικοί και συνήθως αποτελούν τυχαία ευρήματα (συνηθέστερα από κολονοσκόπηση). Ιστολογικώς εμφανίζουν επιμήκυνση των αυλών των βλεννογόνιων αδένων, με σύγχρονη τάση κυστικής διατάξεως. Οι υπερπλαστικοί πολύποδες δεν εξαλλάσσονται και συχνά υποστρέφονται. Λόγω του γεγονότος πως δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερο κίνδυνο, δε χρήζουν και ιδιαίτερης παρακολούθησης. [17,18,19]

Αμαρτωματώδεις πολύποδες- Σύνδρομο Cowden

Οι αμαρτωματώδεις πολύποδες είναι είτε μονήρεις σε παιδιά ή πολλαπλοί στο σύνδρομο Peutz – Jeghers. Σπάνιο, κληρονομούμενο κατά τον σωματικό επικρατούντα χαρακτήρα σύνδρομο, με προσβολή πολλών οργάνων (πολλαπλά αμαρτώματα του δέρματος, ινοκυστική νόσος και καρκίνωμα μαστού). [20]

Συνηθέστερες είναι οι εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό. Αυτές περιλαμβάνουν τη δημιουργία πολλαπλών πολυπόδων σε όλο το σύστημα με διάφορη καλοήγη ιστολογική εμφάνιση. [20,21]

Σύνδρομο Peutz – Jeghers

Το σύνδρομο Peutz – Jeghers πρόκειται για ένα σύνδρομο με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Υπάρχει εμφάνιση πολλαπλών μισχωτών ή άμισχων αμαρτωματοδών πολυπόδων στο στόμαχο, στο λεπτό και παχύ έντερο από μικρή ηλικία. Αυτοί οι πολύποδες συνοδεύονται από υπέρχρωση του δέρματος και των βλεννογόνων (μελανωτικές κηλίδες μικρού μεγέθους που κάνουν την εμφάνισή τους από νεογνική ηλικία και είναι εντελώς καλοήθεις). Με την πάροδο του χρόνου το χρώμα στις κηλίδες εξασθενεί σε μεγάλο βαθμό, όμως οι βλάβες των βλεννογόνων παραμένουν εφόρου ζωής.[22] Στο σύνδρομο αυτό παρατηρείται αυξημένη επίπτωση καρκίνου τόσο του παχέος εντέρου-ορθού (ΚΠΕ) όσο και άλλων οργάνων, όπως του παγκρέατος, των μαστών, των ωοθηκών και των όρχεων. Στους ασθενείς με σύνδρομο Peutz-Jeghers υπάρχει κληρονομική μετάλλαξη σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 19 (19p13.3) και κωδικοποιεί μια κινάση της σερίνης/θρεονίνης . [22,23]

Φλεγμονώδεις πολύποδες

Οι φλεγμονώδεις πολύποδες εμφανίζονται ως υποβλεννογόνια οζίδια, κυρίως στο ορθό. Παρουσιάζονται σε σοβαρές μορφές φλεγμονωδών παθήσεων του παχέος εντέρου αλλά δεν εξαλλάσσονται.

Λεμφοειδείς πολύποδες

Οι λεμφοειδείς πολύποδες δεν είναι τυπικοί πολύποδες και οφείλονται σε υπερπλασία του υποβλεννογόνιου λεμφικού ιστού. Αποτελούν τοπικές εντοπισμένες υπεργέρσεις του βλεννογόνου του παχέος εντέρου. Η εντύπωση πολυπόδων δίνεται κατά τον βαριούχο υποκλυσμό. Αποτελούν το 15% των πολυπόδων στα παιδιά. Η εμφάνισή τους ξεκινά το πρώτο έτος ζωής ενός παιδιού, με τη μέγιστη συχνότητα να αγγίζεται στο τρίτο έτος. Μετά το πέμπτο έτος ελαττώνονται σταδιακά. Συνήθως είναι πολλαπλοί και εκδηλώνονται με χρόνια απώλεια αίματος. Η διάγνωση γίνεται με

βαριούχο υποκλυσμό, ενδοσκόπηση και βιοψία. Δεν χρειάζονται ιδιαίτερη θεραπεία γιατί υποστρέφονται. [24,25]

Νεανικοί πολύποδες

Οι νεανικοί πολύποδες κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Παρατηρούνται ως μονήρεις σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 10 ετών (< 10 ετών) και σπάνια σε ενήλικες. Η συχνότητα τους είναι 1%. Συνηθέστερα εντοπίζονται στο σιγμοειδές και το ορθό. Όταν είναι περισσότεροι του ενός αναπτύσσονται και στο υπόλοιπο παχύ έντερο, ενώ μπορεί να προσβάλλουν το στόμαχο και το λεπτό έντερο (γενικευμένη νεανική πολυποδίαση). Έχουν μικρή ικανότητα κακοήθους εξαλλαγής και συνήθως συνυπάρχουν με αδενώματα. Οι πολύποδες είναι συνήθως έμμησχοι, μικροί με διάμετρο από 3mm έως 2 εκ., ιστολογικά δε, χαρακτηρίζονται από άφθονο οιδηματώδες χόριο με κυστικά διατεταμένα αδένια. Επίσης είναι σφαιρικοί, λείοι και καλύπτονται με βλέννη. Χαρακτηρίζονται από παρουσία κυστικών σχηματισμών σε ιστολογικό επίπεδο. Πολύ συχνά είναι αδύνατον να διακριθούν από τους φλεγμονώδεις πολύποδες. Η διάγνωση γίνεται με κολonosκόπηση και το βαριούχο υποκλυσμό διπλής αντιθέσεως. [26]

2.1.2. Νεοπλασματικές επιθηλιακές βλάβες

Καλοήθεις πολύποδες

Οι πολύποδες του παχέος εντέρου είναι μαλακά, σαρκώδη ή ινώδη τμήματα που αναπτύσσονται στη βλεννώδη εσωτερική επιφάνεια του εντέρου. Πολύποδες του παχέος εντέρου είναι δυνατόν να σχηματίζονται στο 40% έως 50% του πληθυσμού. Ο αριθμός και το μέγεθος των πολυπόδων αυξάνεται με την ηλικία, ιδιαίτερα σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό πολυπόδων και καρκίνο του παχέος εντέρου. Στην αιτιολογία των πολυπόδων παίζει σημαντικό ρόλο η διατροφή. Οι πολύποδες μπορούν να έχουν διάφορα μεγέθη και σχήματα. Η μικροσκοπική τους εξέταση μπορεί να δείξει διαφορετικές ιστολογικές μορφές. Οι περισσότεροι πολύποδες έχουν καλοήγη ιστολογία. Μερικοί από αυτούς τους πολύποδες έχουν την ικανότητα να εξελιχθούν σε καρκίνο (κακοήθης εξαλλαγή). Πρόκειται για προκαρκινικές καταστάσεις-αλλοιώσεις και οι πολύποδες αυτοί ονομάζονται αδενώματα. Ο κύριος και καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκινώματος είναι το μέγεθος του

πολύποδα. Χρειάζονται περίπου από 5 έως 10 χρόνια για ένα καλοήγη πολύποδα να εξελιχθεί σε καρκίνο.

Αδένωμα

Τα αδενώματα (αδενωματώδεις πολύποδες) ξεκινούν πάντα ως γνήσια καλοήγη νεοπλάσματα και παρατηρούνται στο 60% των ατόμων ηλικίας μεγαλύτερης των 60 ετών. Μπορεί να είναι μικροί ή μεγάλοι, μισχωτοί ή επίπεδοι. Η συχνότητά τους αυξάνει με την ηλικία και εμφανίζονται σε όλο το μήκος του παχέος εντέρου. (40% δεξιό κόλο, 40% αριστερό κόλο και 20% στο ορθό.) Υπάρχει ταξινόμηση και κατανομή των αδενωμάτων ιστολογικά. [27,28] Επίσης κατατάσσονται ανάλογα και με το βαθμό δυσπλασίας που παρουσιάζουν στα κύτταρά τους, δηλαδή το βαθμό της εκτροπής τους από το κανονικό-φυσιολογικό, σε ήπιας, μέτριας και υψηλής διαφοροποίησης. Ο κύριος καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκινώματος είναι το μέγεθος του πολύποδα. Σωληνώδη αδενώματα με διάμετρο <1 εκ. έχουν ελάχιστο κίνδυνο σε αντίθεση με άμισχα λαχνωτά αδενώματα διαμέτρου > 4εκ. όπου ο κίνδυνος βρίσκεται περίπου στο 40%. Τα λαχνωτά συνήθως έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο από τα σωληνώδη λόγω μεγαλύτερου μεγέθους. Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των αδενωμάτων και ο βαθμός δυσπλασίας τους τόσο πιο εύκολα ευνοείται και η εξαλλαγή σε κακοήθεια. Επίσης στην εξαλλαγή σε κακοήθεια παίζει σημαντικό ρόλο και ο αριθμός των αδενωμάτων. Όλες οι αδενωματώδεις βλάβες χαρακτηρίζονται από τον πολλαπλασιασμό και τη δυσπλασία (διαφόρων βαθμών) των επιθηλιακών κυττάρων. Με βάση την αρχιτεκτονική τους δομή διακρίνονται ιστολογικά. [29]

Ιστολογική διάκριση αδενωμάτων

Σωληνώδες αδένωμα

Η πλειοψηφία των σωληνωδών αδενωμάτων εμφανίζεται στο ορθό και στο σιγμοειδές κόλον. Είναι η πιο συχνή μορφή αδενώματος, με τη μεγαλύτερη συχνότητα. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία σωληνωδών αδένων. Είναι συνήθως μισχωτό, με διάμετρο που ποικίλλει από χιλιοστά έως και λίγα εκατοστά (διάμετρο 2,5 εκ). Ο μίσχος καλύπτεται από φυσιολογικό βλεννογόνο, αλλά στην κεφαλή αναγνωρίζεται αύξηση της πυκνότητας των αδένων και των επιθηλιακών κυττάρων.

Είναι συχνά ασυμπτωματικό και αποτελεί τυχαίο εύρημα της κολονοσκοπήσεως. Μπορεί να προκαλέσει αιμορραγία από το κατώτερο πεπτικό με χροιά ζωηρή ερυθρή ή σκοτεινόχρωμη, εξαρτώμενη από την εντόπιση του πολύποδα. Η επιθηλιακή δυσπλασία μπορεί να είναι χαμηλού, μετρίου ή υψηλού βαθμού. Η τελευταία είναι συνώνυμη με το καρκίνωμα *in situ*. [10,213]

Λαχνωτό ή θηλώδες αδένωμα

Είναι σπανιότερο του σωληνώδους αδενώματος με συχνότητα στο 1% των αδενωμάτων. Έχει σημαντικά ψηλότερη πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής. Πρόκειται για λείες, μαλακές, άμισχες βλάβες. Μακροσκοπικώς εμφανίζουν θηλώδεις προεκτάσεις του βλεννογόνου που επενδύονται συνήθως από δυσπλαστικό επιθήλιο. Κλινικώς προκαλούν βλεννοαιματηρές κενώσεις, τεινισμό, δυσκοιλιότητα, κωλικοειδή άλγη και σπανιότερα ατελή ειλεό. Η διάγνωση τίθεται με τον βαριούχο υποκλυσμό και την κολονοσκόπηση. Τα λαχνωτά αδενώματα υποτροπιάζουν τοπικώς σε ποσοστό 15% στις περιπτώσεις ενδοσκοπικής αφαιρέσεως, ενώ τα σωληνώδη είναι σπάνια. Ο κίνδυνος μετάχρονου καρκίνου μετά από αφαίρεση αδενώματος στο παχύ έντερο ή στο ορθό είναι μεγαλύτερος όταν οι βλάβες ήταν πολλαπλές ή το αδένωμα ήταν άμισχο, λαχνωτό με διάμετρο μεγαλύτερη των 2 εκ. [10,213]

Σωληνολαχνωτό αδένωμα

Αποτελεί το 5-10% των αδενωμάτων. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία τόσο σωληνωδών αδένων όσο και λαχνών.

2.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου

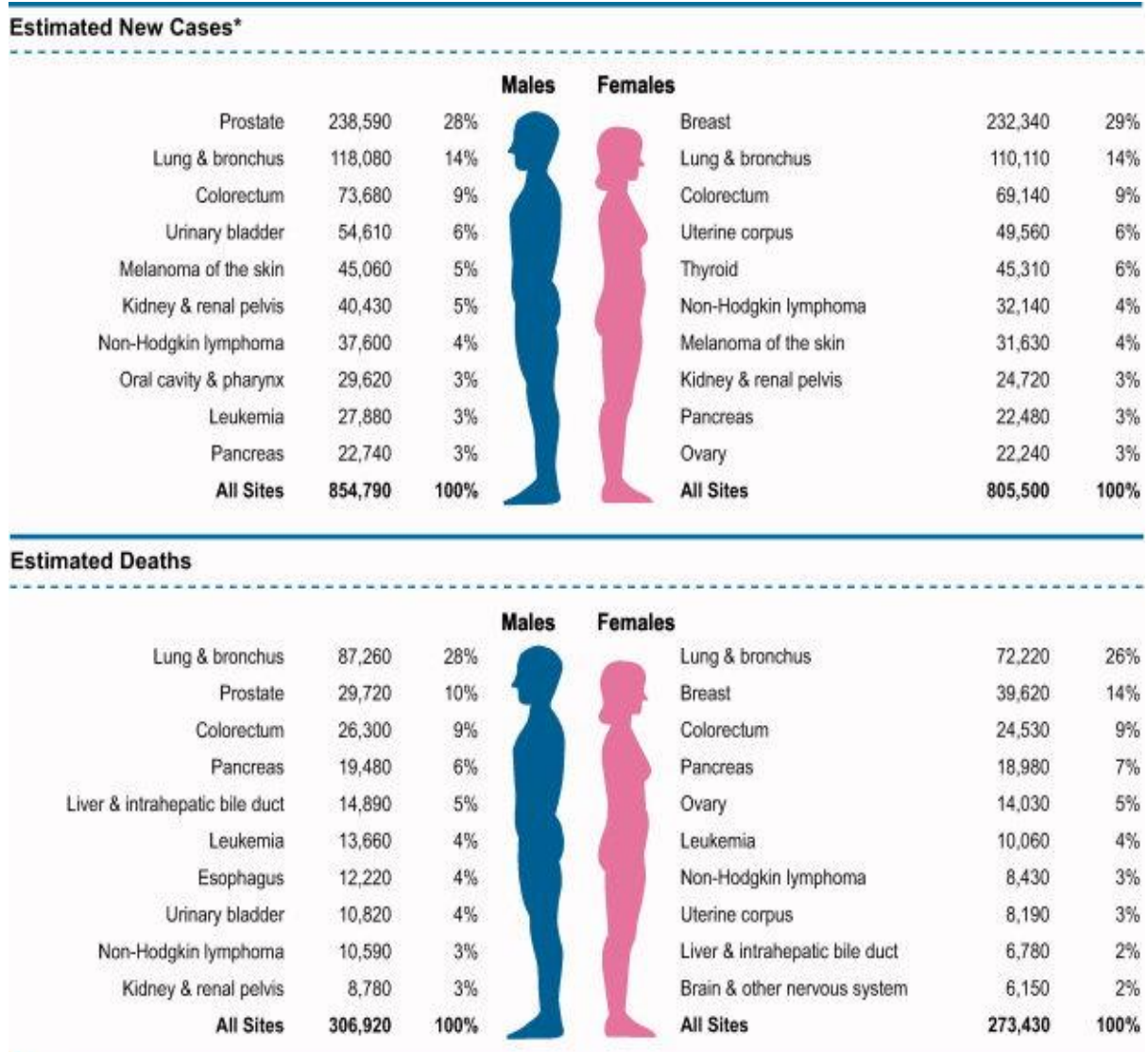
Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου και ορθού αποτελεί μείζον ιατροκοινωνικό πρόβλημα λόγω της υψηλής του συχνότητας και της σημαντικής θνησιμότητας. Υπολογίζεται ότι περίπου 850.000 άτομα προσβάλλονται κάθε χρόνο σε ολόκληρο τον κόσμο. Με σημαντικό παράγοντα και ποσοστό στις βιομηχανικά αναπτυγμένες χώρες ο καρκίνος του παχέος εντέρου αντιπροσωπεύει το 15% του συνόλου των νεοπλασιών και ευθύνεται σε γενικότερο πλαίσιο για το 18% των θανάτων από καρκίνο ετήσια. Ο Κ.Π.Ε. αποτελεί μια αρκετά συχνή πάθηση του πεπτικού συστήματος και είναι δεύτερη σε συχνότητα και θνησιμότητα μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, τόσο στις Η.Π.Α. όσο και στις χώρες της Δυτικής Ευρώπης. Η συχνότητα του ΚΠΕ ποικίλλει με τη μεγαλύτερη να απαντάται σε Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Ευρώπη και Βόρεια Αμερική και τη μικρότερη στην κεντρική Ασία και Αφρική. Η συχνότητα της νόσου αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία των 40-50 ετών και έκτοτε ακολουθεί σταθερά αυξητική πορεία, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 65 έτη. [31,32] Σύμφωνα με το American Cancer Society η μέση επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου παγκόσμια είναι 16,6 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό για τους άνδρες και 14,7 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό για τις γυναίκες. Για τον καρκίνο του ορθού οι αντίστοιχοι αριθμοί είναι 11,7 και 7,7 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό. [34] Η Ελλάδα καταλαμβάνει τη χαμηλότερη θέση στην επίπτωση και θνητότητα του καρκίνου του παχέος εντέρου και ορθού ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η επίπτωση ανέρχεται σε 15,2 και η θνητότητα σε 8,4 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό. Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και του ορθού το οποίο και αποτελεί το 75%-80% των περιπτώσεων προσβάλλει και τα δυο φύλα, στις γυναίκες όμως είναι συχνότερος ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ιδίως του δεξιού κόλου ,ενώ στους άνδρες ο καρκίνος του ορθού. [32,33]

Τα τελευταία χρόνια η θνησιμότητα από ΚΠΕ ελαττώνεται προοδευτικά. Αυτό οφείλεται πιθανόν στην πρόωμη διάγνωση μέσω του πληθυσμιακού ελέγχου (screening), καθώς και στη βελτίωση της θεραπευτικής αντιμετώπισης (χειρουργική, ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία). [31,34]

Δέκα είδη καρκίνου για εκτιμώμενα νέα περιστατικά και θνητότητα σε άρρενες και θήλειες. Η.Π.Α. Στατιστικά 2013

(Ten Leading Cancer Types for the Estimated New Cancer Cases and Deaths by Sex, United States, 2013.)

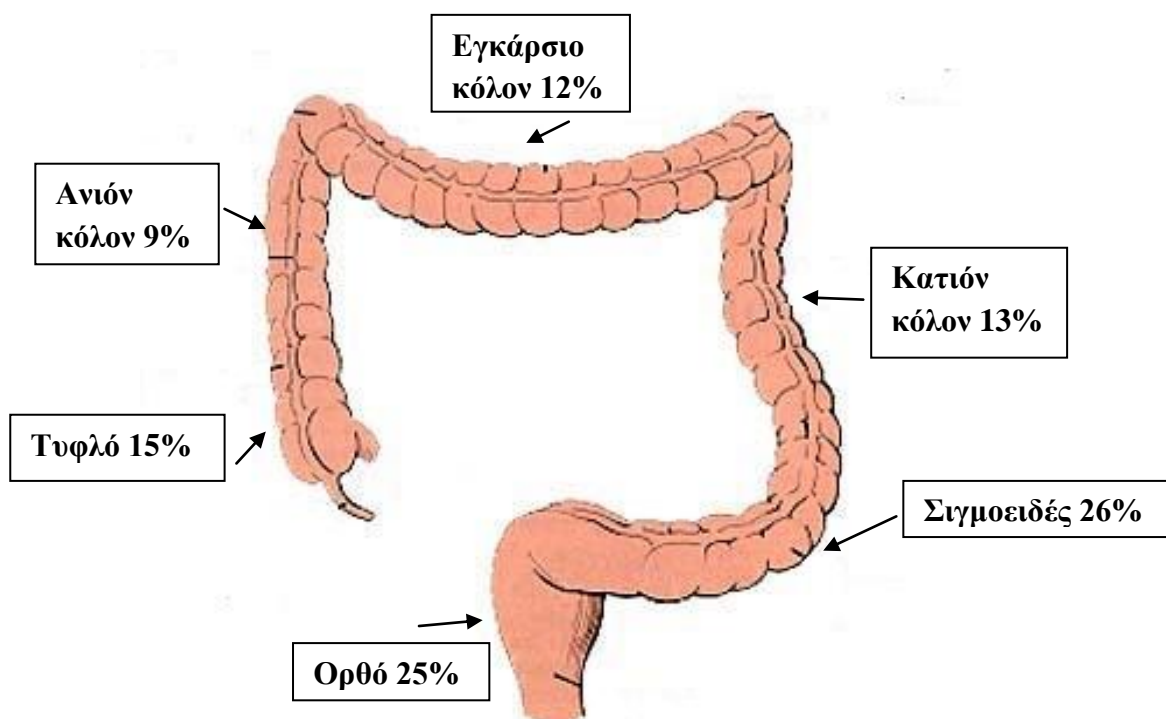


National Center for Health Statistics (NCHS) (Rebecca Siegel et.al) Cancer statistics, 2013

Εντόπιση

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου εμφανίζει διαφορετική κατανομή στα διάφορα τμήματα του εντέρου. Στο τυφλό εντοπίζεται σε ποσοστό 15%, στο ανιόν κόλον 9%, στο εγκάρσιο 12%, στο κατιόν 13%, στο σιγμοειδές 26% και 25% στο ορθό. Από την κατανομή αυτή παρατηρούμε πως το συντριπτικό ποσοστό πάνω από 50% των καρκίνων εντοπίζονται στο ορθοσιγμοειδές. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως μπορούν να διαγνωσθούν μόνο με τη δακτυλική εξέταση και την ορθοσιγμοειδοσκόπηση. Πολλαπλοί σύγχρονοι καρκίνοι του παχέος εντέρου βρίσκονται στο 5%. [35] Στο ίδιο περίπου ποσοστό ανέρχεται και η πιθανότητα να εμφανισθεί ένας καινούριος καρκίνος σε ένα έντερο ασθενούς από το οποίο προηγουμένως έχει αφαιρεθεί ένας άλλος πρωτοπαθής καρκίνος (μετάχρονος καρκίνος).

Ποσοστιαία Εντόπιση Και Κατανομή Καρκίνου Παχέος Εντέρου Στα Διάφορα Τμήματα Του Εντέρου



Αιτιολογικοί παράγοντες

1) Γενετικοί παράγοντες και οικογενειακό ιστορικό :

1.1) Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP): Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση αποτελεί σύνδρομο που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα. Αποτελεί σπάνιο γενετικό σύνδρομο που ποσοστιαία αποτελεί το 1% των περιστατικών καρκίνου παχέος εντέρου. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ενίοτε από την παιδική ηλικία, πολλαπλών αδενωμάτων (από λίγα έως πολλές χιλιάδες) σε όλη την έκταση του παχέος εντέρου. Η γενετική ανωμαλία της νόσου εντοπίζεται στη γενετική μετάλλαξη του APC γονιδίου (ογκοκατασταλτικό γονίδιο εντοπιζόμενο στη περιοχή 5q21-q22). [36] Κληρονομούμενες μεταλλάξεις του APC γονιδίου, όπως στη περίπτωση του FAP, καταλήγει σε κύτταρα που περιέχουν ένα μεταλλαγμένο αντίγραφο και ένα φυσιολογικό αντίγραφο του γονιδίου. Οι ασθενείς κληρονομούν ένα μεταλλαγμένο APC αλληλίο από ένα προσβεβλημένο γονέα. Υπάρχει μια αλληλουχία από γενετικά γεγονότα, τα οποία επιτρέπουν στους αδενωματώδεις πολύποδες να γίνουν κακοήθεις σε ασθενείς με FAP. Η διεργασία είναι παρόμοια με εκείνη που συμβαίνει και στα αδενώματα. [37,38] Ως αποτέλεσμα, η APC πρωτεΐνη θεωρείται η πύλη προς τη νεοπλασία του κόλου με πιθανότητα και κίνδυνο εμφάνισης αδενοκαρκινώματος σε αυτούς τους ασθενείς να είναι σχεδόν 100% (ιδιαίτερα κατά την πέμπτη δεκαετία της ζωής τους). Η θεραπεία της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης βασίζεται κυρίως στην ενδοσκοπική παρακολούθηση των ασθενών για αποκάλυψη της ενάρξεως της πολυποδίασεως. Ακολουθώντας η χειρουργική θεραπεία θα προλάβει την ανάπτυξη του καρκίνου και επιμηκύνεται και η επιβίωση. [39] Επίσης υπάρχει και συντηρητική θεραπεία με χορήγηση κάποιων φαρμάκων ώστε να μειωθεί ο αριθμός και το μέγεθος των πολυπόδων. Τα φάρμακα δεν κατέχουν πρωτεύουσα θέση σαν μονοθεραπεία στους ασθενείς με FAP, που δεν έχουν υποβληθεί σε χειρουργική θεραπεία. Ασθενείς με FAP χωρίς θεραπεία έχουν προσδόκιμο επιβιώσεως μέχρι την ηλικία των 42 ετών. Για αυτό το λόγο ο οικογενειακός έλεγχος των ασθενών με FAP θα πρέπει να αρχίζει από μικρή ηλικία και εφόσον κρίνεται επαρκής έως ότου ο ασθενής γίνει 35 ετών, κατόπιν κάθε 3 χρόνια ώστε να υπάρξει μια έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση. [39,40]

1.2) Κληρονομικός μη πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC) ή Σύνδρομο Lynch:

Μία άλλη μορφή κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου που εμφανίζει οικογενειακή συρροή, είναι ο κληρονομικός, μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (HEREDITARY NONPOLYPOSIS COLORECTAL CANCER- HNPCC) . Το σύνδρομο HNPCC ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Lynch στα μέσα της δεκαετίας του 60 [41,42]. Αποτελεί περίπου το 3%-7% των περιστατικών ΚΠΕ. Περιγράφει την εμφάνιση ενός κληρονομικού συνδρόμου το οποίο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου, αλλά και ορισμένων άλλων νεοπλασιών (συνήθως καρκίνου του ενδομητρίου) σε άτομα της ίδιας οικογένειας. Το σύνδρομο χαρακτηρίστηκε εξ' αρχής σαν γονιδιακή διαταραχή κληρονομούμενη με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. [43,44] Ύποπτος για τη νόσο είναι καθένας που έχει τουλάχιστον τρεις εξ' αίματος συγγενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, ένας εκ των οποίων διαγνώσθηκε σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών. Η μορφή αυτή δύσκολα διακρίνεται από τη σποραδική πολυποδίαση και ευθύνεται για μεγαλύτερο ποσοστό καρκίνου του παχέος εντέρου από ότι η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP). Τα κυριότερα σημεία διαφορο-διάγνωσης του είναι το οικογενειακό ιστορικό, η τάση πρώιμης έναρξης του, καθώς και η συνύπαρξη του με άλλες μορφές καρκίνου (του ενδομητρίου, του ουροποιητικού συστήματος, του στομάχου ή των χοληφόρων οδών). Από τη γενετική μελέτη των συγγενών των ασθενών με μη πολυποδιακό καρκίνο του παχέος, προέκυψαν ευρήματα που συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης ότι η προδιάθεση σχετίζεται με ένα είδος γενετικής αστάθειας που εκδηλώνεται με διάχυτες μεταβολές σε βραχείες, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA (μικροδορυφόρους). [44] Πρόκειται για οικογενές σύνδρομο στην παθογένεια του οποίου εμπλέκονται κληρονομικές μεταλλάξεις σε κάποιο από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA. Φυσιολογικά αυτά τα λάθη στην αντιγραφή, επισκευάζονται από τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, MMR (mismatch repair) αλλά κατά την απουσία τους οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες τα συσσωρεύουν. [45] Έτσι ο αριθμός των καταλοίπων του DNA σε ένα μικροδορυφόρο μειώνεται ή αυξάνεται. Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργείται η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). [44,46] Ουσιαστικά το HNPCC είναι μια πάθηση που εκδηλώνεται με βλάβη του DNA λόγω ελαττωμάτων κατά τη συνήθη διαδικασία επιδιόρθωσης του. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI Microsatellite Instability) χαρακτηρίζει το

σύνδρομο HNPCC σε ποσοστό που φθάνει το 90%, ενώ συναντάται και στο 10%-15% των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου και του ορθού. Η μεγαλύτερη ως σήμερα πρόοδος που έχει επιτευχθεί αναφορικά με το σύνδρομο είναι η ανεύρεση της γονιδιακής του βάσης. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωρισθεί 7 διακριτά MMR γονίδια που συνοδεύουν τον HNPCC και όλα εμπλέκονται στον μηχανισμό MMR (MISMATCH REPAIR SYSTEM). Πληθώρα μελετών έχουν δείξει τα τελευταία χρόνια μεταλλάξεις κυρίως στα γονίδια hmsb6, hmsb2, hmh11, hrms2 και hrms1. Οι μεταλλάξεις των hLMH1 και hLMH2 γονιδίων ευθύνονται για το 70% των MMR μεταλλάξεων στον HNPCC των κλινικά αναγνωριζόμενων περιπτώσεων του συνδρόμου, ενώ ποσοστό 10% αφορούν μετάλλαξη του hMSH6 γονιδίου. Τα γονίδια τα υπεύθυνα για τα υπόλοιπα 20-25% των περιπτώσεων δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί. [44,45,46] Αν και τα άτομα που κληρονομούν το HNPCC γονίδιο δεν αναπτύσσουν όλα καρκίνο, εν τούτοις έχουν κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου που ανέρχεται σε μεγάλο ποσοστό της τάξεως 70-80%. [47] Το σύνδρομο Lynch δεν έχει ειδική προδιάθεση. Όμως, από εθνικής απόψεως έχουν παρατηρηθεί ειδικές μεταλλάξεις στους Σουηδούς και τους Φινλανδούς. Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ιδιαίτερα συχνός στους Εβραίους Ασκενάζι, πιθανόν συχνότερος από οποιαδήποτε άλλη εθνική ομάδα παγκοσμίως. Αν και κανένα από τα HNPCC ή FAP είναι συχνότερα στους Εβραίους Ασκενάζι απ' ότι στο γενικό πληθυσμό, όμως αμφότερα έχουν μία συσχέτιση με τη κληρονομικότητα της εθνικής αυτής υποομάδας. Μία ειδική μετάλλαξη του MSH2 γονιδίου, G1906K, ανευρίσκεται σε 2-3% όλων των ορθο-κολικών καρκίνων των Εβραίων Ασκενάζι, ηλικίας <60 ετών. [48,49] Επίσης, 1/3 των ατόμων της υποομάδας αυτής που ανταποκρίνονται στα κριτήρια της γενετικής δοκιμασίας του HNPCC έχουν αυτή τη μετάλλαξη, η οποία είναι σπάνια στο γενικό πληθυσμό. Διεθνώς, παρατηρούνται μεγάλες γεωγραφικές διαφορές στη συχνότητα του HNPCC. Ο HNPCC είναι εξ ίσου συχνός στους άνδρες και τις γυναίκες αποτελώντας περίπου το 7% των περιστατικών ΚΠΕ. Έχουν αναπτυχθεί δύο ειδών κριτήρια για την αναγνώριση των ασθενών με HNPCC. [49] Τα κριτήρια Amsterdam I τα οποία θέτουν σαν προϋπόθεση τη λήψη ενός λεπτομερούς οικογενειακού ιστορικού ορθοκολικού καρκίνου, το οποίο περιλαμβάνει τον αριθμό των προσβεβλημένων ασθενών, τον βαθμό συγγενείας και την ηλικία των ασθενών κατά το χρόνο της διαγνώσεως. Το 1999 τα κριτήρια αναθεωρήθηκαν προκειμένου να περιλάβουν και εξωεντερικούς καρκίνους και είναι γνωστά ως Amsterdam criteria II.

Παρακάτω παραθέτουμε τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληροί κάποιος ασθενής με βάση τα Amsterdam criteria II [50]

Amsterdam criteria II

- Τουλάχιστον τρεις συγγενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο HNPCC-σχετιζόμενο καρκίνο (ΚΠΕ, ενδομήτριου, λεπτού εντέρου, ουρητήρα, νεφρικής πυέλου), ένας εκ των οποίων θα πρέπει να είναι πρώτου βαθμού συγγενής με τους άλλους δύο (εξαιρείται η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση).
- Ηλικία διάγνωσης ενός τουλάχιστον εκ των πασχόντων πριν από τα 50 έτη
- Προσβολή από τη νόσο τουλάχιστον δύο διαδοχικών γενεών

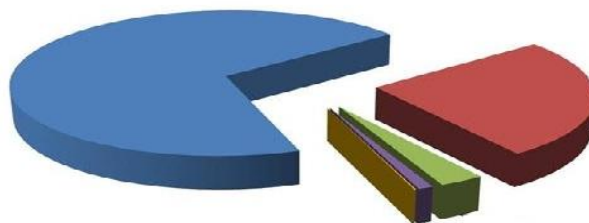
Το δεύτερο είδος κριτηρίων είναι τα κριτήρια Bethesda τα οποία είναι περισσότερο ελαστικά από τα Amsterdam criteria II. [50] Τα κριτήρια αυτά περιλαμβάνουν και τη δοκιμασία μικροδορυφορικής αστάθειας στα ιστολογικά παρασκευάσματα του καρκίνου προκειμένου να αναγνωρισθούν οικογένειες που έχουν MMR μετάλλαξη (μετάλλαξη γονιδίων επιδιόρθωσης). Η κολεκτομή είναι ο πιο σίγουρος τρόπος να προλάβουμε την ανάπτυξη του καρκίνου ή να αντιμετωπίσουμε ένα υπάρχοντα καρκίνο. Η εξέταση του όγκου (δηλαδή IHC ,MSI , γενετική BRAF μετάλλαξη), η κλειστή παρακολούθηση και η προφυλακτική θεραπεία έχουν όλα συμβάλλει στη μείωση των θανάτων των ασθενών με HNPCC ή σύνδρομο Lynch.






Bethesda criteria : (απαιτείται η πλήρωση ενός εκ των ακολούθων)

- Πάσχοντες από καρκίνο, οι οικογένειες των οποίων πληρούν τα Amsterdam II κριτήρια
- Πάσχοντες από δύο HNPCC-σχετικούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων σύγχρονων και μετάχρονων ορθοκολικών καρκίνων ή σχετιζομένων εξωκολικών καρκίνων (ενδομητρίου, ωοθηκών, στομάχου, ήπατος-χοληφόρων, λεπτού εντέρου, ουρητήρα και νεφρικής πυέλου)

- Πάσχοντες από ορθοκολικό καρκίνο και πρώτου βαθμού συγγενείς με ορθοκολικό καρκίνο και/ή HNPCC-σχετικό εξωκολικό καρκίνο και/ή ορθοκολικό αδένωμα (ένας από τους καρκίνους με ηλικία διάγνωσης πριν από τα 50 έτη και το αδένωμα με ηλικία διάγνωσης πριν από τα 40 έτη)
- Πάσχοντες από ορθοκολικό καρκίνο ή καρκίνο ενδομητρίου με ηλικία διάγνωσης πριν από τα 50 έτη
- Πάσχοντες από καρκίνο αδιαφοροποίητης μορφής ιστοπαθολογικά, που εντοπίζεται στο δεξιό κόλον και διαγιγνώσκεται πριν από την ηλικία των 50 ετών
- Πάσχοντες από ορθοκολικό καρκίνο κυτταρικού τύπου signet-ring και ηλικία διάγνωσης πριν από τα 50 έτη
- Πάσχοντες από αδένωμα που διαγιγνώσκεται πριν από την ηλικία των 40 ετών

ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΣΕ ΠΟΣΟΣΤΑ



	ΣΠΟΡΑΔΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	80%
	ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	15-25%
	HNPCC /ΣΥΝΔΡΟΜΟ Lynch	3-7%
	ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΑΔΕΝΩΜΑΤΩΔΗΣ ΠΟΛΥΠΟΔΙΑΣΗ (FAP)	<1%
	ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	<1%

2) Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

2.1) Διατροφικοί παράγοντες: Πολλά είδη τροφίμων έχουν βρεθεί να παίζουν μεγάλο βλαπτικό ρόλο για την ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου . Το ίδιο ισχύει και για διάφορα θρεπτικά συστατικά. Υπάρχει βέβαια και ο αντίποδας και για τις δυο αυτές κατηγορίες. Οι διατροφικοί παράγοντες δείχνουν να συσχετίζονται περισσότερο με τον καρκίνο του παχέος εντέρου από ότι με οποιοδήποτε άλλη νεοπλασία. Γενικά οι μακροχρόνιες έρευνες συναντούν πολλές δυσκολίες στην πραγματοποίησή τους λόγω του γεγονότος ότι τα στοιχεία που αναλύονται έχουν έναν πολύ σημαντικό περιορισμό. Ο περιορισμός αυτός είναι πως τα στοιχεία προέρχονται από αυτά που ανακαλεί στη μνήμη του ο ασθενής όσον αφορά για τις διατροφικές του συνήθειες. Για την αντικειμενικότητα των συμπερασμάτων πρέπει να καλυφθεί ένα μεγάλο χρονικό διάστημα με αποτύπωση των διατροφικών συνηθειών του ασθενούς.

Η αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος (κατά συνέπεια ζωικής προέλευσης πρωτεΐνης και λίπους) συνοδεύεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου παχέος εντέρου. Ειδικότερα, άτομα τα οποία καταναλώνουν κρέας και έχουν πολύ χαμηλή πρόσληψη λαχανικών εμφάνιζαν 8 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο παχέος εντέρου σε σχέση με αυτούς που καταναλώνουν μικρή ποσότητα κρέατος και έχουν υψηλή πρόσληψη λαχανικών. Επίσης μελέτες αναφέρουν τον επιβαρυντικό ρόλο των κορεσμένων λιπών και τον προστατευτικό ρόλο των πολυακόρεστων λιπών. [53,54] Όσον αφορά τα φυτικά λίπη δεν έχει αποδειχθεί να παίζουν επιβαρυντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου. Αντικρουόμενες είναι οι απόψεις για το εάν η αυξημένη κατανάλωση κρέατος (και ως εκ τούτου ζωικού λίπους) συνοδεύεται με τον ίδιο κίνδυνο για την εμφάνιση καρκίνου σε όλες τις θέσεις του κόλου και του ορθού. Σημαντικό ρόλο έχει δείξει να παίζει και ο τρόπος μαγειρέματος και ο βαθμός ψησίματος του κρέατος με την εμφάνιση καρκίνου παχέος εντέρου. Τα άτομα που καταναλώνουν το κρέας υπερβολικά ψημένο φαίνεται να βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο από άλλους που το προτιμούν πιο ήπια ψημένο. Αρκετά ύποπτος και επιβαρυνμένος θεωρείται και ο βρασμός του κρέατος, πιθανώς λόγω απελευθέρωσης υψηλών ποσοτήτων καρκινογόνων ουσιών όπως αμμωνίας, νιτροζαμινών, νιτρικών ενώσεων και ετεροκυκλικών αμινών. [55] Η διατροφή που είναι πλούσια σε λίπη, φτωχή σε ίνες και πλούσια σε ραφιναρισμένους υδατάνθρακες επίσης αυξάνει τη

δραστηριότητα της β-γλυκορονιδάσης, ένα ένζυμο που εκκρίνεται από τα τοξικά βακτήρια και που μπορεί να παράγει καρκινογόνες ουσίες μέσα στο κόλον.

Επίσης η προστατευτική δράση των φρούτων και των λαχανικών είναι πολυπαραγοντική κυρίως λόγω της ποσότητας του άπεπτου φυτικού υπολείμματος το οποίο εξασκεί προστατευτική δράση . Οι αυξημένες ποσότητες βιταμινών και κυρίως

- i. της β-καροτίνης,
- ii. της βιταμίνης C,
- iii. της ριβοφλαβίνης (Βιταμίνη B2) και
- iv. του φιλικού οξέως

που περιέχουν τα φρούτα και τα λαχανικά παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην προστασία από τη καρκινογένεση και βοηθούν στην άμυνα και τη θωράκιση του οργανισμού. [56,57,61-63] Η β-καροτίνη αναφέρεται και μελετάται αυτόνομα και όχι σαν βιταμίνη Α μαζί με τη ρετινόλη. [56,57] Και αυτό γιατί η δράση των δυο αυτών ουσιών φαίνεται να είναι διαφορετική. Η β-καροτίνη φέρεται να έχει προστατευτική δράση σε όλους τους τύπους καρκίνου σε αντίθεση με τη ρετινόλη η οποία αναφέρεται είτε σαν επιβαρυντικός παράγοντας, είτε σαν θρεπτικό συστατικό με ουδέτερη δράση. Η προστατευτική δράση της βιταμίνης C έχει αναφερθεί από πολλές μελέτες και φαίνεται κυρίως να εξασκείται μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης. Παρουσιάζεται δε, να μπορεί να αντισταθμίζει και τα βλαπτικά αποτελέσματα άλλων ομάδων τροφίμων. [59] Η Βιταμίνη Β2 ή ριβοφλαβίνη έχει επίσης προστατευτική δράση ενάντια στην ανάπτυξη του καρκίνου. Το φιλικό οξύ θεωρείται από τους πιο ισχυρούς προστατευτικούς παράγοντες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ωστόσο ο μεταβολισμός του έχει εξαιρετικό βαθμό πολυπλοκότητας και δυσκολίας και η συχνή ύπαρξη μεταλλάξεων στα ένζυμα που τον διαμεσολαβούν κάνουν την εξαγωγή συμπερασμάτων ιδιαίτερα επισφαλή. [57]

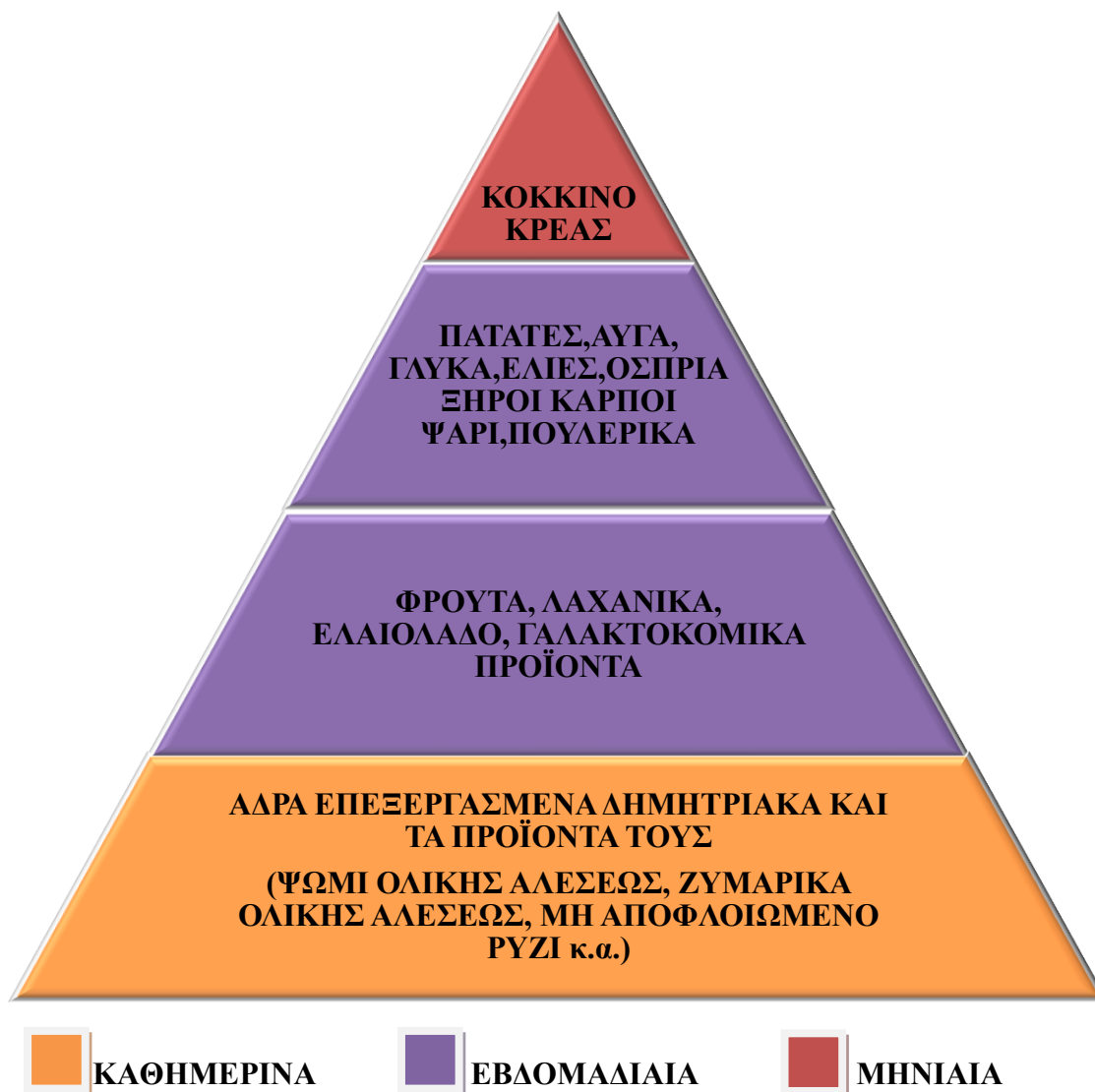
Ο σίδηρος αναφέρεται να έχει επιβαρυντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Και πολύ περισσότερο όταν στο εντερικό περιεχόμενο υπάρχει σημαντική ποσότητα λίπους. Έντονο είναι το ενδιαφέρον και για το ρόλο του ασβεστίου το οποίο ως φαίνεται έχει προστατευτική δράση. [60] Τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, αυξημένη πρόσληψη ασβεστίου σχετίζεται με μειωμένες πιθανότητες προσβολής από

καρκίνους του πεπτικού συστήματος και ειδικότερα για καρκίνο του παχέος εντέρου. Τέλος κάποια ιχνοστοιχεία όπως το σελήνιο και διάφορες βιταμίνες όπως η Ε φαίνεται να ασκούνε προστατευτική δράση χωρίς να υπάρχει όμως μεγάλος αριθμός στοιχείων που να μας το εξασφαλίζουν. [58]

Τα ψάρια και τα θαλασσινά τα οποία είναι πλούσια σε φυτικό λίπος έχουν συσχετισθεί με προστατευτικό ρόλο απέναντι στη δημιουργία καρκίνου του παχέος εντέρου. [63,64]

ΤΥΠΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ



ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΦΥΣΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

2.2) Αλκοόλ: Σύμφωνα με το World Cancer Research Fund, η κατανάλωση πάνω από 30-50 γρ. αλκοόλ τη μέρα διπλασιάζει τον κίνδυνο καρκινογένεσης στο ορθό και στο παχύ έντερο. Σε μια απλή αναλογία 10 γραμμάρια αλκοόλης αντιστοιχούν σε 120ml κρασί, 300ml μύρας ή 30ml αποσταγμένων ποτών (με 80% περιεκτικότητα σε αλκοόλ). Το αλκοόλ καθώς μεταβολίζεται σε ακεταλδεύδη, μπορεί να επιφέρει αλλοιώσεις στα κύτταρα και να τροποποιήσει αρνητικά το μεταβολισμό των καρκινογόνων ουσιών. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση μύρας λόγω της μεγάλης της περιεκτικότητας σε νιτροζαμίνες, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη Κ.Π.Ε.. [61]

2.3) Κάπνισμα: Το κάπνισμα ενοχοποιείται για αύξηση της συχνότητας του καρκίνου του παχέος εντέρου και τη θνητότητα. Τα άτομα που κάνουν κατάχρηση τσιγάρου για μεγάλο χρονικό διάστημα έχουν 2.5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου από ότι οι μη καπνίζοντες. Την ίδια επιβάρυνση φαίνεται να έχει και το κάπνισμα καπνού με τη μορφή πούρου ή με πίπα όπως και με τα βιομηχανικά τσιγάρα. Ο κίνδυνος αυτός εξαρτάται από τη διάρκεια και την ποσότητα του καπνίσματος. Ο κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου φαίνεται να ελαττώνεται σημαντικά με τη διακοπή του καπνίσματος. Δεδομένων δε και των άλλων βλαβερών συνεπειών του καπνίσματος, η διακοπή του θεωρείται ούτως ή άλλως ωφέλιμη. [51,65,66]

2.4) Παχυσαρκία και Δείκτης Μάζας Σώματος: Το υπερβάλλον σωματικό βάρος και η παχυσαρκία, άρα ταυτόχρονα και ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου και συγκεκριμένα η κεντρική παχυσαρκία, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένο σπλαχνικό (ενδοκοιλιακό) λίπος. [65,67]

2.5) Καφές: Η κατανάλωση καφέ μέχρι σήμερα θεωρείται ότι ούτε προστατεύει άλλα ούτε και προδιαθέτει σε εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου.

2.6) Σωματική άσκηση - Φυσική Δραστηριότητα: Η απουσία σωματικής άσκησης προδιαθέτει σε ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Επομένως η υιοθέτηση συστηματικής σωματικής άσκησης (π.χ. βόλτα μισής ώρας ημερησίως) και φυσικής δραστηριότητα αποτελεί ένα πολύ ικανοποιητικό τρόπο πρόληψης, μειώνοντας το σχετικό κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου χωρίς φυσικά να υπολογίζονται οι ευνοϊκές επιδράσεις του βαδίσματος στην απώλεια βάρους, την

πρόληψη καρδιοπαθειών κλπ. [67]. Πληθώρα δημοσιευμένων μελετών δείχνουν μείωση της συχνότητας καρκίνου παχέος εντέρου σε ενήλικες που ασκούνται συστηματικά. [68]

Πίνακας: Επιπτώσεις κινδύνου από κατανάλωση σημαντικών ομάδων τροφίμων σε δέκα σημαντικές μορφές καρκίνου (Lagiou et al, 2002)

ΚΑΡΚΙΝΟΣ	ΛΑΧΑΝΙΚΑ	ΦΡΟΥΤΑ	ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΡΕΑΣ	ΑΛΚΟΟΛ	ΒΙΤΑΜΙΝΗ D	ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	ΦΥΤΙΚΕΣ ΙΝΕΣ
ΦΑΡΥΓΓΑ-ΣΤΟΜΑΤΟΣ	↓↓↓	↓↓↓		↑↑↑				
ΟΙΣΟΦΑΓΟΥ	↓↓↓	↓↓↓		↑↑↑				
ΣΤΟΜΑΧΟΥ	↓↓↓	↓↓↓		↑				
ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	↓↓↓	↓↓	↑↑	↑	↓	↑	↓↓↓	↓
ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	↓	↓	↑			↑		↓
ΛΑΡΥΓΓΑ	↓↓	↓↓		↑↑↑				
ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ	↓↓↓	↓↓						
ΜΑΣΤΟΥ	↓↓	↓↓		↑↑		↓↓↑↑↑	↓	
ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ	↓↓	↓↓						
ΗΠΑΤΟΣ				↑↑↑				

Αντίστροφη Συσχέτιση



Θετική Συσχέτιση



Ενδεχόμενη Αντίστροφη Συσχέτιση



Ενδεχόμενη Θετική Συσχέτιση



Πιθανή Αντίστροφη Συσχέτιση



Πιθανή Θετική Συσχέτιση



2.6) Φάρμακα: Κλινικές μελέτες των τελευταίων ετών επιβεβαιώνουν τον προστατευτικό ρόλο των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ)-NSAIDs (Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) και ιδιαίτερα της ασπιρίνης αλλά και των αντιρρευματικών φαρμάκων στην πρόληψη εμφάνισης καρκίνου και πολυπόδων του παχέος εντέρου. [69,71,72,77] Ιδιαίτερα στην βοήθεια της πρόληψης του καρκίνου παχέος εντέρου με τη χρήση ασπιρίνης έρχεται να επιβεβαιώσει και η μελέτη των Thun et al. [70] Τα φάρμακα αυτά όμως μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές παρενέργειες και αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπ όψιν όταν συστήνεται η λήψη ασπιρίνης ως προφυλακτικής ουσίας για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Γίνεται λόγος για μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου έως και 50% σε άτομα τα οποία λάμβαναν πάνω από 20 δισκία ασπιρίνης το μήνα. [70,74-76] Τα ΜΣΑΦ διακρίνονται σε αυτά που αναστέλλουν και τις δυο κυκλοοξυγενάσες και σε αυτά που σε θεραπευτικές δόσεις έχουν ανασταλτική δράση μόνο ως προς την COX-2, χωρίς να επηρεάζουν την COX-1 με αποτέλεσμα να διατηρούν σε σημαντικό βαθμό τις γαστροπροστατευτικές ιδιότητες των προσταγλανδινών που προκύπτουν από τη δράση της COX-1 στο αραχιδονικό οξύ. [73,76] Η αναστολή της COX-1 οδηγεί σε επιθηλιακές βλάβες, αιμορραγία και άλλες γαστρεντερικές διαταραχές ενώ η αναστολή της PGE2 (Prostaglandin E2) μέσω της αναστολής της COX-2 οδηγεί σε αντιφλεγμονώδες αποτέλεσμα. Έτσι η ασπιρίνη αναστέλλοντας την COX-2 μπορεί να μειώσει την παραγωγή PGE2 που αποτελεί ουσία ευοδωτική για την ανάπτυξη νεοπλασίας. Η ασπιρίνη θεωρείται ο ισχυρότερος αναστολέας της παραγωγής προσταγλανδινών. Επίσης έχει μια σημαντική ιδιότητα που στερούνται τα υπόλοιπα ΜΣΑΦ. Μπορεί να διεγείρει την COX-2 ώστε να παράγει 15R-υδροξυ-εικοσιτετρανοϊκό (15R-HETE) οξύ, το οποίο είναι γνωστός αναστολέας της ανάπτυξης όγκων. [70,77]

2.7) Αναπαραγωγικοί παράγοντες και θεραπεία ορμονικής αντικατάστασης : Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων ή ακόμα και η θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα δεν επηρεάζει την εμφάνιση κολοορθικού καρκίνου. Οι απόψεις σχετικά με την επίδραση ορμονικών (ενδογενή οιστρογόνα, αντισυλληπτικά δισκία) και αναπαραγωγικών παραγόντων (εμμηναρχή, αριθμός κηύσεων, εμμηνόπαυση) δείχνουν να δίστανται. [80,81,83-85] Μελέτες δείχνουν πως άτεκνες γυναίκες εμφανίζουν συχνότερα καρκίνο παχέος εντέρου από ότι πολύτεκνες μητέρες. Ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι εκ διαμέτρου

αντίθετα. [83] Άλλοι υποστηρίζουν πως ο μεγάλος αριθμός κυήσεων προδιαθέτει για ανάπτυξη νεοπλασίας στο έντερο, άλλοι πως οι πολύτεκνες μητέρες βρίσκονται σε χαμηλότερο κίνδυνο από ότι άλλες. [84] Οι περισσότερες μελέτες σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δείχνουν πως η θεραπεία ορμονικής αντικατάστασης μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου παχέος εντέρου (Κ.Π.Ε.). [80-82] Βλέπουμε πως η συσχέτιση των αναπαραγωγικών και ορμονικών παραγόντων με την εμφάνιση του καρκίνου στο παχύ έντερο είναι σε αρχικό στάδιο εξερεύνησης ακόμα και ως εκ τούτου και τα αποτελέσματα των εργασιών που υπάρχουν αντικρουόμενα. [79-85]

3) Συνθήκες εργασίας και Καρκίνος του Παχέος εντέρου

Άτομα τα οποία εργάζονται τη νύχτα υποβάλλονται σε τεχνητό φως και στερούνται το φυσικό φως. Αυτή η έκθεση του οργανισμού σε τεχνητό φως τη νύχτα, καταστέλλει τη φυσιολογική παραγωγή μελατονίνης από τον εγκέφαλο. Ο κύκλος παραγωγής μελατονίνης γίνεται συνεχώς από τον εγκέφαλο με σημείο υψηλότερης παραγωγής τα μεσάνυχτα διότι επηρεάζεται από το φως του ηλίου. Η νυχτερινή εργασία καταστέλλει την παραγωγή μελατονίνης και αυξάνει τη σύνθεση άλλων ορμονών όπως τα οιστρογόνα.

Αποτελέσματα μελέτης από το Πανεπιστήμιο του Harvard πάνω σε έρευνα μας έδειξε τα εξής αποτελέσματα. Ερευνήθηκε η συσχέτιση καρκίνος παχέος εντέρου – νυχτερινή εργασία. Πραγματοποιήθηκε έρευνα σε 78.586 νοσοκόμες μέσα στα πλαίσια μακρόχρονης έρευνας διάρκειας 10 ετών. [88] Οι συγκεκριμένες νοσοκόμες λόγω προγράμματος δουλειάς έπρεπε να εργάζονται με τα συστήματα της βάρδιας τουλάχιστον 3 φορές το μήνα για μια ολόκληρη νύχτα (για 15 ή/και περισσότερα χρόνια). Τα αποτελέσματα των ερευνητών έδειξαν ότι οι γυναίκες αυτές είχαν 35% μεγαλύτερο κίνδυνο να παρουσιάσουν καρκίνο παχέος εντέρου.

Εδώ ανακύπτει ένα μεγάλο βιοηθικό ερώτημα το οποίο χρήζει απάντησης στο αν και κατά πόσο η διακοπή παραγωγής μελατονίνης λόγω της πλήρους αϋπνίας κατά τη νυχτερινή εργασία συστηματικά αποτελεί προσμετρήσιμο παράγοντα καρκινογένεσης για τις γυναίκες.[86-88] Αντίστοιχη έρευνα που αφορά τον ανδρικό πληθυσμό δημοσιεύτηκε στην «Αμερικανική Επιθεώρηση Επιδημιολογίας». Βασίστηκε σε 3.137 άνδρες οι οποίοι διαγνώστηκαν με διάφορες μορφές καρκίνου. Όσον αφορά τους άνδρες που εργάζονται νύχτα και με συνθήκες αϋπνίας (άρα διακοπή

φυσιολογικής παραγωγής μελατονίνης) τα αποτελέσματα είναι εξίσου ανησυχητικά όσον αφορά την δημιουργία νεοπλασίας με τον καρκίνο του προστάτη να έχει την πρώτη θέση και την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου τη δεύτερη θέση. Για τους καρκίνους του προστάτη αλλά και του παχέος εντέρου, ο κίνδυνος ήταν υψηλότερος μεταξύ των ανδρών οι οποίοι εργάζονταν νύχτα επί τουλάχιστον 10 χρόνια.

Διάγνωση

Η διάγνωση για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Κ.Π.Ε.) πραγματοποιείται με την ενδοσκόπηση του παχέος εντέρου με κάποιες μεθόδους. Η ενδοσκόπηση περιλαμβάνει την κολonosκόπηση και την ορθοσκόπηση. Έπειτα υπάρχει ο βαριούχος υποκλυσμός «διπλής αντιθέσεως», η αξονική τομογραφία κοιλίας, η μαγνητική τομογραφία κοιλίας και η «εικονική κολonosκόπηση» η οποία επιβεβαιώνεται με την ιστολογική εξέταση δειγμάτων του όγκου που λαμβάνονται μέσω των ενδοσκοπίων. [89-93] Παρακάτω θα δούμε ενδεικτικά τις προαναφερθείσες μεθόδους διάγνωσης για τον Κ.Π.Ε.. Σύσταση: Έναρξη ελέγχου στην ηλικία των 50 ετών και για τα δύο φύλα με μια από τις ακόλουθες μεθόδους:

- Βαριούχος υποκλυσμός - ακτινογραφία

Για να πραγματοποιηθεί η ακτινογραφία του παχέος εντέρου (βαριούχος υποκλυσμός) σε ακτινολογικό εργαστήριο προηγείται καθαρισμός του εντέρου. Με τον βαριούχο υποκλυσμό δεν υπάρχει η δυνατότητα να ληφθεί τεμαχίδιο από τον όγκο και να εξετασθεί ιστολογικά (βιοψία), δυνατότητα την οποία παρέχει μόνο η εξέταση μέσω του κολonosκοπίου. Τα νεοπλάσματα εμφανίζονται ως ανώμαλες στενώσεις ή ως σκιαγραφικά ελλείμματα (εικόνα φαγωμένου μήλου). Λαμβάνονται πολλαπλές ακτινογραφίες σε διάφορες θέσεις προκειμένου να ελεγχθούν όλα τα τμήματα του εντέρου. [96-97] Σε περίπτωση που με το βαριούχο υποκλυσμό βρεθεί ύποπτη αλλοίωση ή στην περίπτωση που δεν υπάρχουν ευρήματα αλλά η κλινική υποψία είναι ισχυρή πραγματοποιείται κολonosκόπηση. Η ευαισθησία της μεθόδου του βαριούχου υποκλυσμού φθάνει το 50-80% για πολύποδες μικρότερους του ενός εκατοστού, το 70-90% για πολύποδες μεγαλύτερους του ενός εκατοστού και το 55-85% για πρώιμο καρκίνο.

- Εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση

Καταδεικνύει ένα μεγάλο ποσοστό της τάξεως του 75% όλων των ΚΠΕ. Όμως το 18% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση θα χρειαστούν στη συνέχεια ολική κολonosκόπηση. Ποσοστό 60% των ΚΠΕ που θα διαπιστωθούν με τη μέθοδο αυτή είναι πρώιμου σταδίου. Υπάρχει (μικρός) κίνδυνος αιμορραγίας ή διάτρησης και δεν πρέπει να εφαρμόζεται σε ομάδες υψηλού κινδύνου. [93]

- Κολonosκόπηση

Αποτελεί την πλέον κατάλληλη μέθοδο ελέγχου του πληθυσμού για καρκίνο παχέος εντέρου. Συνιστάται η εφαρμογή της σε όλες τις ομάδες υψηλού κινδύνου. Απαιτεί ενδοσκόπο επαρκώς εκπαιδευμένο. Είναι δυνατό να είναι ατελής λόγω μη καλής εντερικής προετοιμασίας. Μπορεί να διενεργηθεί με ασφάλεια ακόμα και σε άτομα ηλικίας 80 ετών ή και μεγαλύτερης ηλικίας. Η μέθοδος αυτή θεωρείται σήμερα ως η μέθοδος εκλογής για τον έλεγχο του παχέος εντέρου λόγω της δυνατότητας που προσφέρει όχι μόνο να δίνει άριστη οπτική εικόνα του εσωτερικού του εντέρου αλλά και να καθιστά επιπλέον εφικτή την λήψη βιοψιών από τις συνευρισκόμενες βλάβες καθώς και την εκτέλεση θεραπευτικών επεμβάσεων, όπως αφαίρεση πολυπόδων και αιμόσταση. Η διαγνωστική αξία της μεθόδου φθάνει το 90%, αφού μπορεί να ανιχνεύσει εξαιρετικά καλά βλάβες μικρότερες του ενός εκατοστού και επιφανειακές αλλοιώσεις του βλεννογόνου. [94,95] Εν τούτοις υπάρχει κάποιος κίνδυνος θανάτου (1-3/10,000 εξετάσεις), διάτρησης (1-4/1000 εξετάσεις) και αιμορραγίας (1%) και υπάρχει αμφιβολία και προβληματισμός αν θα πρέπει να εφαρμόζεται και σε άτομα χαμηλού κινδύνου. Ασθενείς με πολύποδες παχέος εντέρου πρέπει να ελέγχονται περιοδικά με κολonosκόπηση για τον κίνδυνο εμφάνισης πολυπόδων σε άλλο χρονικό διάστημα μετά την πολυποδεκτομή.

- Εικονική κολonosκόπηση - 3D virtual Colonoscopy

Πολλά υποσχόμενη για τη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου αλλά και για την παρακολούθηση των ασθενών με Κ.Π.Ε. είναι η εικονική κολonosκόπηση (3D virtual Colonoscopy). Αποτελεί μια σύγχρονη επαναστατική μέθοδο, η οποία με ελάχιστη επεμβατικότητα απεικονίζει το παχύ έντερο στο σύνολό του και επιτρέπει την αξιολόγηση πληθώρας ευρημάτων και τον έγκαιρο εντοπισμό παθολογικών

καταστάσεων όπως πολύποδες, εκκολπάματα και καρκινώματα. Η εικονική κολονοσκόπηση αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο της κολονοσκόπησης και πρόκειται για νέα τεχνική υπολογιστικής απεικόνισης τριών διαστάσεων του παχέος εντέρου που βρίσκει εφαρμογή σε άτομα που δεν επιθυμούν ή δεν είναι δυνατό να υποβληθούν σε κολονοσκόπηση. [97-99] Η ευαισθησία της μεθόδου στο να καταδείξει πολύποδες, αδενώματα και καρκινώματα είναι συγκρίσιμη με αυτήν της συμβατικής κολονοσκόπησης για πολύποδες μεγέθους μεγαλύτερου των 6mm. Η διαδικασία πραγματοποιείται με εισαγωγή αέρα μέσω ενός μικρού ρύγχους που τοποθετείται με τοπική αναισθησία στον πρωκτό και ακολουθεί τομογραφία της κοιλιακής χώρας κατά την ύπτια και τη πρηνή θέση του ασθενούς. Ο κύριος περιορισμός της εικονικής κολονοσκόπησης είναι η δόση ακτινοβολήσης, η οποία είναι σχετικά υψηλή, επειδή η εξέταση πραγματοποιείται όπως προαναφέραμε σε πρηνή και ύπτια θέση και με λεπτές τομές. Μειονεκτεί σημαντικά λόγω της αδυναμίας λήψης βιοψιών ή εκτέλεσης θεραπευτικών επεμβάσεων. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί η συχνή διαπίστωση ευρημάτων εκτός παχέος εντέρου, επίσης δεν χρήζει χρήσης αναισθητικών φαρμάκων και είναι ανώδυνη καθώς επίσης και το γεγονός ότι μπορεί να εξετάσει περιοχές που το ενδοσκόπιο δεν μπορεί να φτάσει λόγω ανατομικών προβλημάτων, κακής συνεργασίας του ασθενή ή ύπαρξης εμποδίων στον αυλό του εντέρου.

Άλλες εξετάσεις όπως το υπερηχογράφημα ήπατος και η ακτινογραφία θώρακα έχουν ιδιαίτερη σημασία για να διαπιστώσουμε πιθανές ηπατικές και πνευμονικές μεταστάσεις. Το ήπαρ είναι το όργανο στο οποίο εμφανίζονται πιο συχνά μεταστάσεις από τον καρκίνο του παχέος εντέρου με ποσοστό κάπου στο 50% με 70% των ασθενών. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μοναδικός μεταξύ των καρκίνων, όπου η χειρουργική αφαίρεση της μετάστασης έχει σαν αποτέλεσμα την επιμήκυνση της επιβίωσης καθώς και την πλήρη θεραπεία σε ορισμένες περιπτώσεις. Σήμερα είναι δυνατόν μετά από ηπατεκτομή να επιτευχθεί 5ετής επιβίωση της τάξης του 25-30%. Δυστυχώς όμως ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών (75-80%) είναι ανεγχείρητο και ο συνδυασμός άλλων τεχνικών και θεραπειών είναι απαραίτητες για να παραταθεί η επιβίωση. Εν αντιθέσει με το ήπαρ που οι μεταστάσεις είναι σε μεγάλο ποσοστό οι πνευμονικές μεταστάσεις θα εμφανίσουν σε ποσοστό 10 % με 20% των ασθενών και από αυτούς λιγότεροι από 2% θα είναι υποψήφιοι για μεταστασεκτομή. Εντούτοις υπό τις προϋποθέσεις της εξαιρεσίμης μεταστατικής

πνευμονικής νόσου η 5ετής επιβίωση μετά από πνευμονεκτομή μπορεί να φθάσει σε επίπεδα 20 - 30%. Απαραίτητες προϋποθέσεις και για την ηπατεκτομή αλλά και την πνευμονεκτομή είναι η πρωτοπαθής εστία να έχει ελεγχθεί και να είναι εφικτή η εκτομή των μεταστάσεων σε υγιή όρια. Το διορθικό υπερηχογράφημα και η αξονική τομογραφία προσφέρουν ακριβείς πληροφορίες για το βάθος της διηθήσεως του εντερικού τοιχώματος και την παρουσία διογκωμένων παραορθικών λεμφαδένων για την προεγχειρητική σταδιοποίηση του νεοπλάσματος. [89-93]

Ομάδες Κινδύνου ανάπτυξης Καρκίνου Παχέος Εντέρου

• Ομάδες υψηλού κινδύνου

Στις ομάδες υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου περιλαμβάνονται:

- Άτομα με ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου,
- Ασθενείς με μακροχρόνια εκτεταμένη ελκώδη κολίτιδα ή νόσο του Crohn
- Άτομα τα οποία ανήκουν σε οικογένειες με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο του παχέος εντέρου (οικογενής αδενωματοώδης πολυποδίαση -FAP-, σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου -HNPCC-).

Άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου πρέπει να υποβάλλονται σε τακτικά χρονικά διαστήματα σε κολονοσκόπηση, ανεξάρτητα από την ηλικία τους. [97]

• Ομάδες μέσου κινδύνου

Στις ομάδες μέσου κινδύνου περιλαμβάνονται άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών. Μετά την ηλικία αυτή η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία ζωής. Φυσιολογικά άτομα, ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμασία ανίχνευσης αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα κάθε χρόνο και σε σιγμοειδοσκόπηση κάθε 3 ή 5 χρόνια, η (καλύτερα) σε ολική κολονοσκόπηση ανά 10ετία.

Είδη καρκίνου του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι κυρίως αδenoκαρκίνωμα (98% των καρκίνων του οργάνου) και αποτελεί μία από τις συχνότερες μορφές καρκίνου στις βιομηχανικά αναπτυγμένες χώρες. Το αδένωμα (αδενωματούδης πολύποδας) θεωρείται η πρόδρομος βλάβη του αδenoκαρκινώματος. Η παθογένεση του έχει διερευνηθεί ενδελεχώς τα τελευταία χρόνια λόγω της συχνότητας του αλλά και της σχετικά εύκολης προσέγγισής του με το ενδοσκόπιο (κυρίως μέσω της κολonosκόπησης). Το αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου εξελίσσεται μέσα από μια αλληλουχία διακριτών μορφολογικά αλλοιώσεων από το φυσιολογικό επιθήλιο, στην επιθηλιακή υπερπλασία, στο σχηματισμό αδενώματος που σταδιακά μεγαλώνει και τελικά παθαίνει κακοήγη εξαλλαγή. [98-103] Εμφανίζει μεγάλες διαφορές στο βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων. Έτσι τα καλώς διαφοροποιημένα αδenoκαρκινώματα σχηματίζουν αδένες όμοιους με εκείνους του φυσιολογικού εντερικού βλεννογόνου. Λιγότερο συχνός είναι ο κολλοειδής ή βλενώδης καρκίνος και τέλος σε ποσοστό 5% μπορεί να παρατηρηθεί αμετάπλαστος καρκίνος, ο οποίος είναι υψηλού βαθμού κακοήθειας με πολύ κακή πρόγνωση. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου εκδηλώνεται ως μη επείγουσα κατάσταση (75,2%), επείγουσα κατάσταση με οξεία εντερική απόφραξη (18%) ή επείγουσα κατάσταση με εικόνα εντερικής απόφραξης και περιτονίτιδας (6,8%). Ο Κ.Π.Ε. δεν παρουσιάζει υπεροχή σε κάποιο από τα δυο φύλα.

Μακροσκοπικά ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού διακρίνεται σε:

- ❖ **Πολυποειδή ή ανθοκραμβοειδή:** Εμφανίζεται σαν μεγάλη ανθοκραμβοειδής μάζα με ανώμαλη συνήθως επιφάνεια που προβάλλει μέσα στον αυλό του εντέρου. Παρουσιάζει μικροσκοπική αιμορραγία και επίσης ταχεία αύξηση του μεγέθους. Εντοπίζεται συχνότερα στο τυφλό και στο άνω τριτημόριο του ορθού. εμφανίζει νέκρωση γι' αυτό συνήθως υπάρχει εξέλκωση σε κάποιο σημείο του όγκου.
- ❖ **Ελκωτικό :** Εμφανίζεται σαν ένα τυπικό κακώηδες έλκος και καταλαμβάνει τμήμα ή ολόκληρο τον εντερικό αυλό και συνεπώς μπορεί να προκαλέσει στένωση. Έχει ρυπαρό πυθμένα και ανώμαλα χείλη.
- ❖ **Δακτυλιοειδή ή στενωτικό:** ο δακτυλιοειδής θεωρείται προχωρημένη μορφή του ελκωτικού καρκίνου και έχει διήθηση κυκλοτερός και στα τέσσερα

τεταρτημόρια του εντερικού τοιχώματος. Εντοπίζεται κυρίως στο σιγμοειδές και στο κατιόν κόλον.

- ❖ **Διηθητικό:** Προκαλεί διάχυτη πάχυνση του εντερικού τοιχώματος (με έκταση 5 έως 8 εκ.). Αυτή η πάχυνση καλύπτεται κατά το μεγαλύτερο μέρος από βλεννογόνο, συνήθως όμως με παρουσία εξέλκωσης σε κάποιο σημείο. Ο διηθητικός εμφανίζεται συνήθως σε προϋπάρχουσα ελκώδη κολίτιδα.
- ❖ **Κολλοειδή:** Πρόκειται για μεγάλη μάζα με ζελατινοειδή εμφάνιση που εμφανίζει εξέλκωση και διήθηση.

Η ανθοκραμβοειδής μορφή εμφανίζεται συχνότερα στο δεξιό κόλο, ενώ οι στενωτικές μορφές στο αριστερό κόλο χωρίς βέβαια αυτό να αποτελεί και τον κανόνα. Στο ορθό συνήθως εμφανίζονται οι ελκωτικές ή δακτυλοειδείς μορφές και πολύ λιγότερο η ανθοκραμβοειδής μορφή με εξέλκωση. [103-107,213]

Μετάσταση

Μετάσταση είναι η διασπορά του καρκίνου σε διαφορετικές από την πρωτοπαθή εστία. Μεταστατικός όγκος καλείται ο νέος όγκος που δημιουργείται όταν καρκινικά κύτταρα εγκατασταθούν και αρχίσουν να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται με ανεξέλεγκτο ρυθμό σε μια νέα θέση. Έτσι γίνεται κατανοητό ότι τα κύτταρα της μετάστασης προέρχονται από τα κύτταρα της πρωτοπαθούς εστίας. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να χορηγήσουν μεταστάσεις σχεδόν σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Συχνότατα διηθούν τους τοπικούς λεμφαδένες (ωοειδείς δομές που περιέχουν αμυντικά-λεμφικά κύτταρα) γύρω από τον όγκο (επιχώριοι λεμφαδένες). Η λεμφική συμμετοχή μαζί με την πρωτοπαθή εστία καλείται και τοπική νόσος, σε αντιδιαστολή με την μεταστατική νόσο, όπου ο καρκίνος προσβάλλει όργανα ή λεμφαδένες σε απομακρυσμένες θέσεις από την πρωτοπαθή εστία.

Μεταστάσεις και τρόποι επέκτασης:

- ❖ **Λεμφογενώς:** Ο λεμφογενής τρόπος αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τρόπο διασποράς. Όταν το νεόπλασμα ξεπεράσει το εντερικό τοίχωμα η διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων αγγίζει το συντριπτικό ποσοστό της τάξης του 90%. Η διήθηση των λεμφαδένων είναι ανεξάρτητη του μεγέθους της νεοπλασίας. Επιπλέον είναι δυνατόν πολλές φορές μεταξύ των προσβεβλημένων λεμφαδένων και της νεοπλασίας να παρεμβάλλονται υγιείς αδένες. Γι' αυτό το λόγο η τομή περιλαμβάνει μεγάλο τμήμα εντέρου για πλήρη λεμφαγγειακό καθαρισμό για αποφυγή λάθους.
- ❖ **Κατά συνέχεια ιστού:** Οι νεοπλασίες του εντέρου συνήθως επεκτείνονται κυκλοτερώς και μπορούν να καταλάβουν ολόκληρη την περίμετρο του εντέρου. Πρακτική σημασία έχει η επέκταση του καρκίνου κατά τον επιμήκη άξονα και ιδίως η μικροσκοπική διήθηση του τοιχώματος (επέκταση 4 εκ. περιφερικώς και 7εκ. κεντρικώς με το υποβλοννογόνο λεμφικό δίκτυο).
- ❖ **Αιματογενώς:** Ο καρκίνος του παχέος του εντέρου μέσω της πυλαίας φλέβας δίνει μεταστάσεις στο ήπαρ και μέσω των οσφυϊκών και σπονδυλικών φλεβών στον πνεύμονα και στα οστά. Διήθηση των φλεβών συμβαίνει σε ποσοστό 15-50%, χωρίς να ανευρίσκονται πάντα όμως ηπατικές μεταστάσεις.
- ❖ **Μέσω της περιτοναϊκής κοιλότητας:** Αφού διηθηθεί το τοίχωμα του εντέρου μπορεί να αποπέσουν καρκινικά κύτταρα τοπικά ή διάχυτα στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Συνήθως όμως οι μεταστατικές μάζες εντοπίζονται μέσα στην πύελο και κυρίως στην ορθοκυστική και ορθομητρική περιοχή.
- ❖ **Περινευρικώς:** Η διήθηση του περινευρικού χώρου επιτρέπει και την εξάπλωση της νόσου κατά μήκος των νεύρων του παχέος εντέρου. Συνοδεύεται από υψηλό ποσοστό τοπικής υποτροπής με πολύ κακή πρόγνωση.
- ❖ **Ενδοαυλικά:** Πραγματοποιείται πτώση καρκινικών κυττάρων από την επιφάνεια του όγκου και ακόλουθα γίνεται περιφερική εμφύτευσή τους στην τραυματική επιφάνεια της αναστομώσεως. Γι' αυτό το λόγο κατά τη μηχανική προετοιμασία του καρκίνου του ορθοσιγμοειδούς αποφεύγονται οι υποκλυσμοί.

Συμπτωματολογία

Η συμπτωματολογία εξαρτάται από την εντόπιση του καρκίνου, τον ιστολογικό τύπο όπως επίσης και από την έκτασή του [108-109] .

Καρκίνος δεξιού κόλου

- Ανεξήγητη αναιμία (που προέρχεται από μικροσκοπική αιμορραγία του όγκου), εύκολη κόπωση, ζάλη, αδυναμία και δύσπνοια.
- Διάφορα δυσπεπτικά ενοχλήματα ή και πόνος στη δεξιά κοιλία με επέκταση στον ομφαλό.
- Στο 10% των ασθενών έχουμε ως πρώτο σημείο ανάδειξης ψηλαφητή μάζα στο δεξιό λαγόνιο βόθρο.
- Δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη αλλαγή στις συνήθειες του εντέρου ή εντερική απόφραξη.

Καρκίνος αριστερού κόλου

- Αλλαγή των συνηθειών του εντέρου είτε με τη μορφή δυσκοιλιότητας, είτε με τη μορφή διαρροϊκών κενώσεων, είτε με την εναλλαγή των δυο ανωτέρων.
- Αίμα στα κόπρανα, ανάμικτα με βλέννα.
- Πλήρης ή ατελής εντερική απόφραξη

Καρκίνος ορθού

- Επίμονη αποβολή καθαρού αίματος που συνοδεύεται από βλέννη.
- Τεινεσμός και αίσθημα ατελούς αφόδευσης.
- Δημιουργία εσωτερικών συριγγίων
- Συμπτώματα κυστίτιδας ή ουρηθρίτιδας αν διηθηθούν η ουροδόχος κύστη ή ο προστάτης.

Θεραπεία

Η θεραπεία είναι κατά κύριο λόγο χειρουργική και οι εγχειρήσεις διακρίνονται σε ριζικές και παρηγορητικές. Η ακτινοθεραπεία η οποία εφαρμόζεται προεγχειρητικά ή μετεγχειρητικά και η χημειοθεραπεία που χρησιμοποιείται ως κύρια ή ως συμπληρωματική θεραπεία. Η ριζική χειρουργική θεραπεία έχει ως σκοπό την εκτομή μεγάλου τμήματος του εντέρου, με τη συναφαίρεση όλων των επιχώριων λεμφαδένων με ταυτόχρονη προσοχή στο να αποφευχθεί όσο είναι δυνατόν η διαφυγή και διασπορά καρκινικών κυττάρων. Οι ριζικές επεμβάσεις διακρίνονται σε εγχειρήσεις του παχέος εντέρου και σε εγχειρήσεις για τον καρκίνο του ορθού. Για τον ΚΠΕ εφαρμόζονται αντίστοιχα η δεξιά και αριστερή ημικολεκτομή και οι τμηματικές κολεκτομές (εγκαρσιεκτομή, σιγμοειδεκτομή).

Η χειρουργική θεραπεία για τον καρκίνο του ορθού περιλαμβάνει

- ❖ Τη χαμηλή πρόσθια εκτομή του ορθού
- ❖ Τη συνδυασμένη κοιλιοπερινεϊκή εκτομή
- ❖ Τη λαπαροσκοπικά υποβοηθούμενη κολεκτομή
- ❖ Την τοπική εκτομή

Σε ανεγχείρητες περιπτώσεις ή σε περιπτώσεις τοπικής υποτροπής χρησιμοποιούνται κυρίως ως παρηγορητικές μέθοδοι οι εξής

- ❖ Διαθερμοπηξία
- ❖ Κρυοχειρουργική
- ❖ Ακτίνες laser

Ορισμένοι χειρουργοί χρησιμοποιούν τις μεθόδους αυτές και για ριζική θεραπεία των όγκων του ορθού και κυρίως όγκων που δεν έχουν κάνει διασπορά.

Η ακτινοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί είτε προεγχειρητικά είτε μετεγχειρητικά και προσφέρει τα εξής

- ❖ Μεγάλη βοήθεια και βελτίωση της ποιότητας ζωής
- ❖ Καθιστά μη εξαιρεσίμους όγκους εξαιρεσίμους κυρίως λόγω της συρρίκνωσης της μάζας τους από καταστολή της αντιδραστικής φλεγμονής

- ❖ Εφαρμόζεται σε τοπική υποτροπή της νόσου

Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται

- ❖ Ως κύρια ή συμπληρωματική θεραπεία
- ❖ Συνδυάζεται με ανοσοθεραπεία ή ακτινοβολία

Χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν ως στόχο τη σύνθεση του DNA και τους αυξητικούς παράγοντες που σχετίζονται με τον ενδοκυττάριο καταρράκτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της αγγειογένεσης και της απόπτωσης. Το κατεξοχήν χημειοθεραπευτικό φάρμακο είναι η 5-Φθοριοουρακίλη (5-Fluorouracil / 5-FU). Το 1950 για πρώτη φορά χρησιμοποιείται 5-FU ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Η 5-FU είναι ένα ανάλογο πυριμιδίνης, με κυριότερη δράση αυτή του αναστολέα του ενζύμου θυμιδική συνθετάση και κατά συνέπεια την αναστολή της σύνθεσης θυμιδίνης. Αν και η δράση της 5-FU αφορά όλα τα κύτταρα του οργανισμού, τελικά είναι αυξημένη στα έντονα διαιρούμενα κύτταρα, δηλαδή όπως είναι τα καρκινικά. [111-116]

Σε συνδυασμό με την 5-FU χρησιμοποιείται και η λευκοβορίνη (Leukovorin). Η λευκοβορίνη αποτελεί μεταβολίτη του φολικού οξέος και βασικό συνένζυμο για τη σύνθεση των πυρινηκών οξέων κατά την κυτταροτοξική θεραπεία. Η δράση της εντοπίζεται στο να επιτρέπει μια μικρή σύνθεση πυριμιδινών και πουρινών -παρουσία αναστολέα της σύνθεσής τους- ώστε να λαμβάνει χώρα ένας αριθμός απαραίτητων διεργασιών επιδιόρθωσης και μεταγραφής του DNA. [113,114]

Η οξαλιπλατίνη (Oxaliplatin) η οποία χορηγείται με τις προαναφερθείσες ουσίες (5-φθοριοουρακίλη και λευκοβορίνη) σε ένα συνδυασμό που ονομάζεται FolFOX. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα, αν και γνωρίζουμε πως δρα μέσω αναστολής της σύνθεσης του DNA. [112]

Τέλος η ιρινοτεκάνη (Irinotecan) η οποία κι αυτή χορηγείται με την 5-φθοριοουρακίλη και λευκοβορίνη και ο συνδυασμός τους ονομάζεται FolFiri. Η ιρινοτεκάνη αναστέλλει την επιδιόρθωση και μεταγραφή του DNA έχοντας δράση αναστολέα της τοποϊσομεράσης I. [115]

Όσον αφορά την χημειοθεραπεία σε μορφή χαπιού, αυτή είναι προς το παρόν εφικτή με την καπεσιταμίνη (Capecitabine ή Xeloda), που ανήκει στην ομάδα των φθοριοπυριμιδών και μετατρέπεται μετά την λήψη της σε 5-FU εντός του σώματος. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου αρκετά νεότερα φάρμακα έχουν βρεθεί, τα οποία στοχεύουν ειδικά μόρια στα καρκινικά κύτταρα ή στα αγγεία που τροφοδοτούν τους όγκους. [111] Έτσι, φάρμακα όπως η σετουξιμάμπη (cetuximab, Erbitux), η πανιτουμουμάμπη (panitumumab, Vectibix) και η μπεβασιζουμάμπη (bevacizumab, Avastin) έχουν ήδη εγκριθεί και χρησιμοποιηθεί για τον προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου. Πρόκειται για συνθετικά αντισώματα έναντι των όγκων τα οποία δύνανται να χορηγηθούν μόνα τους (βιολογική θεραπεία) ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία.

Πρόγνωση

Οι πιο καθοριστικοί παράγοντες στην επιβίωση των ασθενών είναι :

1. η ύπαρξη των μακρινών μεταστάσεων
2. βαθμός κακοήθειας και η τοπική επέκταση του όγκου
3. η μετάσταση σε τοπικούς λεμφαδένες (ιδιαίτερα ο αριθμός των μεταστατικών λεμφαδένων)
4. ύπαρξη και ποσότητα υπολειπόμενης νόσου

Τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου εμφανίζουν μεγάλες διαφορές ως προς το βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών τους κυττάρων. Η πλειονότητα των συστημάτων κατατάσσουν τους όγκους σε 3 ή 4 κατηγορίες (Βαθμός κακοήθειας 1: όγκοι υψηλής διαφοροποίησης, Βαθμός 2: μέτριας διαφοροποίησης , Βαθμός 3: χαμηλής διαφοροποίησης, Βαθμός 4: αδιαφοροποίητοι όγκοι) . Όμως, η εφαρμογή ταξινόμησης 2 βαθμίδων (χαμηλού βαθμού κακοήθειας για όγκους υψηλής και μέτριας διαφοροποίησης, και υψηλού βαθμού κακοήθειας για χαμηλής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητους όγκους), όχι μόνο μειώνει τις αποκλίσεις μεταξύ Παθολογοανατόμων στο χαρακτηρισμό του όγκου, αλλά αναδεικνύει και τη σαφή θετική προγνωστική αξία των χαμηλού σε σχέση με τους υψηλούς βαθμούς σε κακοήθεια όγκους. [116,117] Τα αμετάπλαστα αδενοκαρκινώματα υψηλής κακοήθειας έχουν πολύ κακή πρόγνωση. Τα μέτρια ή καλά αδιαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα έχουν καλύτερη πρόγνωση.

Σταδιοποίηση

Ο πιο σημαντικός προγνωστικός δείκτης είναι η τοπική έκταση και η διασπορά του νεοπλασματος τη στιγμή της διάγνωσης. Μια πρώτη αδρή σταδιοποίηση της νόσου γίνεται προεγχειρητικά βασιζόμενη στα αποτελέσματα των απεικονιστικών κυρίως μεθόδων, καθώς και διεγχειρητικά από τον χειρουργό. Η τελική σταδιοποίηση της νόσου γίνεται με την ιστολογική εξέταση ολόκληρου του εγχειρητικού παρασκευάσματος. Τα δύο κύρια συστήματα σταδιοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι οι τροποποιήσεις της ταξινόμησης κατά Dukes και η ταξινόμηση κατά TNM (Tumor, Nodes, Metastasis), όπως προτείνεται από την American Joint Committee on Cancer (AJCC) και την International Union Against Cancer. Η πρώτη ταξινόμηση προτάθηκε αρχικά από τον Dukes για τον καρκίνο του ορθού (1937), αποδείχθηκε όμως εξίσου ικανοποιητική και για τον καρκίνο του κόλου. Το σύστημα Dukes είναι απλό και με κλινική σημασία γι' αυτό και χρησιμοποιείται συχνά και σήμερα. Κατά καιρούς προτάθηκαν διάφορες τροποποιήσεις της αρχικής ταξινόμησης κατά Dukes, αλλά τελικά προτάθηκε και επικράτησε από πολλούς η εφαρμογή της ταξινόμησης σύμφωνα με το σύστημα TNM (Tumor, Nodes, Metastasis). Η TNM σταδιοποίηση αναπτύχθηκε εξ αρχής με στόχο να προβλέψει την πρόγνωση των πασχόντων, αλλά η λειτουργία της έχει επεκταθεί και στο σχεδιασμό της θεραπείας και την επιλογή ομάδων ασθενών για κλινικές μελέτες.

Σε αντίθεση με τα άλλα συστήματα σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου το TNM πλεονεκτεί στο ότι ενημερώνεται συνεχώς με σύγχρονα δεδομένα, έχει διεπιστημονικό σχεδιασμό, επιτρέπει την ενσωμάτωση όλων των τεχνολογικών προσεγγίσεων και τέλος έχει ένα περιεκτικό σύνολο κανόνων που εξασφαλίζουν την ομοιόμορφη χρήση. Η πρόγνωση και η πιθανότητα ίασης ή μακράς επιβίωσης σχετίζεται με την ύπαρξη υπολειπόμενης νόσου μετά την πρωτογενή θεραπεία αλλά και την αρχική χειρουργική εξέταση. [118-122] Η TNM σταδιοποίηση περιγράφεται στον πίνακα 1.

Μια άλλη ταξινόμηση του ΚΠΕ και τροποποιήσεις αυτής (MAC), που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι αυτή κατά Astler-Coller. Αντιστοιχία μεταξύ των ταξινομήσεων κατά TNM, Dukes, MAC και Astler-Coller, καθώς και τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης των ασθενών, ανάλογα με το στάδιο, παρατίθενται στον πίνακα 2.

Σταδιοποίηση κατά Dukes

Dukes A (Στάδιο I) - Ο όγκος εντοπίζεται μόνο στο εσωτερικό τοίχωμα του παχέος εντέρου.

Dukes B (Στάδιο II) - Ο Όγκος έχει εισχωρήσει από το εσωτερικό τοίχωμα προς τον μυ χωρίς να προσβάλλει τους λεμφαδένες της περιοχής.

Dukes C (Στάδιο III) - Ο Όγκος έχει επεκταθεί και σε ένα ή περισσότερους λεμφαδένες της περιοχής (Οι λεμφαδένες είναι μέρος του λεμφικού συστήματος και αποτελούν την φυσιολογική άμυνα του οργανισμού εναντίον των μολύνσεων).

Dukes D (Στάδιο IV) - Τα καρκινικά κύτταρα του όγκου έχουν διασκορπιστεί και σε άλλα όργανα του σώματος και έχουν δημιουργήσει δευτεροπαθείς όγκους (μεταστάσεις).

Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά **TNM** (AJCC/IUCC-International Union Against Cancer TNM, 7^η Έκδοση, 2010), όπως προτείνει και η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας ισχύουν τα εξής:

Πρωτοπαθής όγκος (pT)

- pTis: Καρκίνωμα in situ, ενδοεπιθηλιακό χωρίς να υπάρχει διήθηση της βασικής μεμβράνης
- pTis: Καρκίνωμα in situ, με διήθηση του χορίου
- pT1: Επέκταση της διήθησης του νεοπλάσματος έως τον υποβλεννογόνο χιτώνα
- pT2: Επέκταση της διήθησης του νεοπλάσματος έως τον μυϊκό χιτώνα
- pT3: Επέκταση της διήθησης του νεοπλάσματος έως τον ορογόνο ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος επέκταση προς τους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς
- pT4: Ο όγκος διηθεί κατ' επέκταση άλλα όργανα ή διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο

Επιχώριοι λεμφαδένες (pN)

- pN0: Δεν μπορούν να προσδιορισθούν μεταστάσεις σε επιχώριους λεμφαδένες
- pN1a: Μετάσταση σε 1 επιχώριο λεμφαδένα
- pN1b: Μετάσταση σε 2 με 3 επιχώριους λεμφαδένες
- PN2a: Μετάσταση σε 4 με 6 επιχώριους λεμφαδένες
- PN2b: Μετάσταση σε 7 ή και περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (pM)

- pM0: Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
- pM1: Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου κατά TNM

Πίνακας 1

ΣΤΑΔΙΟ 0	Tis, N0, M0
ΣΤΑΔΙΟ I	T1,N0,M0 ή T2, N0, M0
ΣΤΑΔΙΟ IIA	T3,N0,M0
ΣΤΑΔΙΟ IIB	T4,N0,M0
ΣΤΑΔΙΟ IIIA	T1,N1,M0 ή T2,N1,M0
ΣΤΑΔΙΟ IIIB	T3,N1,M0 ή T4,N1,M0
ΣΤΑΔΙΟ IIIC	Οποιοδήποτε T ,N2,M0
ΣΤΑΔΙΟ IV	Οποιοδήποτε T, οποιοδήποτε N ,M1

Πίνακας 2

TNM	Όγκος	Λεμφαδένες	Απομακρυσμένες Μετ/σεις	Dukes-MAC	Astler-Coller	5-ετης επιβίωση (%)
ΣΤΑΔΙΟ 0	Tis	N0	M0	-	Περιορισμένος στον βλεννογόνο	100
ΣΤΑΔΙΟ I	T1	N0	M0	Dukes A, MAC A	Επεκτεινόμενος στον υποβλεννογόνο	100
	T2	N0	M0	Dukes A, MAC B1	Επεκτεινόμενος στον μυϊκό χιτώνα	93,2
ΣΤΑΔΙΟ IIA	T3	N0	M0	Dukes B, MAC B2	Επεκτεινόμενος διαμέσου του μυϊκού χιτώνα	84,7
ΣΤΑΔΙΟ IIB	T4	N0	M0	Dukes B, MAC B3		72,2
ΣΤΑΔΙΟ IIIA	T1-T2	N1	M0	Dukes C, MAC C1	Περιορισμένος στο τοίχωμα του εντέρου/επιχώριοι λεμφαδένες	83,4
ΣΤΑΔΙΟ IIIB	T3-T4	N1	M0	Dukes C, MAC C2-C3	Επέκταση διαμέσου του τοιχώματος του εντέρου/επιχώριοι λεμφαδένες	64,1
ΣΤΑΔΙΟ IIIC	Οποιο/τε T	N2	M0	Dukes C, MAC C1-C2-C3		44,3
ΣΤΑΔΙΟ IV	Οποιο/τε T	Οποιοδήποτε N	M1	Dukes D, MAC D	Απομακρυσμένες μεταστάσεις	8,1

Για την περιγραφή της παρουσίας ή απουσίας υπολειπόμενης νόσου μετά τη θεραπεία (μετεγχειρητική υπολειπόμενη νόσος), έχει εισαχθεί από το 1987 ο παράγων R (residual) που έχει την παρακάτω ταξινόμηση:

RX	Δεν μπορεί να εκτιμηθεί η παρουσία υπολειπόμενης νόσου
R0	Μη υπολειπόμενη νόσος
R1	Μικροσκοπικά υπολειπόμενη νόσος
R2	Μακροσκοπικά υπολειπόμενη νόσος

Ανεξάρτητα από τη χρήση του οποιουδήποτε συστήματος ταξινόμησης αναφορικά με τη σταδιοποίηση του ΚΠΕ χρησιμοποιούνται τα αρχικά από κάποια γράμματα για την καλύτερη εξυπηρέτηση και συνεννόηση μεταξύ των ερευνητών [118-122]:

Κλινικό στάδιο της νόσου (clinical) \Rightarrow C

Παθολογοανατομικό στάδιο της νόσου \Rightarrow P

Το στάδιο της νόσου μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας /ακτινοθεραπείας \Rightarrow y

Τα γράμματα C και P μπορούν να συνδυαστούν με το γράμμα y. Αυτό εξαρτάται αν η αναφορά γίνεται στο κλινικό ή παθολογοανατομικό στάδιο της νόσου.

T: κατά βάθος διήθηση του τοιχώματος του ορθού από τον πρωτοπαθή όγκο. **N:** επιχώριοι λεμφαδένες της νόσου **M:** παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. (τα αρχικά από το σύστημα TNM)

Παρουσία υπολειπόμενης νόσου \Rightarrow R (residual)

ITC (isolated tumor cells): Μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα

Σε οδηγίες από το American Joint Committee of Cancer προτείνουν την εξέταση 12 τουλάχιστον λεμφαδένων στον καρκίνο του παχέος εντέρου με τον ελάχιστο αριθμό να κυμαίνεται από 10 έως 14 λεμφαδένες για να αποκλειστεί με σιγουριά η απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ή αντίστοιχα η παρουσία τους. Αν αναγνωριστούν λιγότεροι από 12 λεμφαδένες, πραγματοποιείται επανεξέταση του ιστολογικού δείγματος. Αν και στην επανεξέταση δεν αναγνωρισθούν 12 λεμφαδένες θεωρείται πως έχει πραγματοποιηθεί πλήρης έλεγχος.

Λεμφαδένας φρουρός

Φρουρός λεμφαδένας είναι ο λεμφαδένας που πρώτος βρίσκεται στην λεμφική οδό ευθύς μετά τον όγκο και είναι ο πρώτος στον οποίο θα ανευρεθεί μετάσταση, εάν αυτή υπάρχει. Αν ο λεμφαδένας φρουρός είναι θετικός τότε σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση και πάντα η αφαίρεση των λεμφαδένων ποικίλει ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, το βαθμό της ιστολογικής διήθησης, την εντόπιση του όγκου. Η ακρίβεια της σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των λεμφαδένων. Η εκτίμηση του φρουρού λεμφαδένα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου παρέχει τη δυνατότητα ακριβέστερης σταδιοποίησης της παθολογίας των λεμφαδένων. Ο φρουρός λεμφαδένας στον ΚΠΕ και η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας θεωρούνται νέες τεχνικές που χρήζουν διερεύνησης. Τα αποτελέσματά τους θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα σε συσχέτιση με τα υπόλοιπα κλινικά και κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα του εκάστοτε ασθενούς.

3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Γενετικές μεταβολές στον καρκίνο του παχέος εντέρου - Γενετική Αστάθεια

3.1 Χρωμοσωμική αστάθεια (chromosome instability, CIN)

Πρόκειται για την πιο συνηθισμένη τύπου αστάθεια που αφορά το σχηματισμό καρκίνου του παχέος εντέρου. Η χρωμοσωμική αστάθεια ανιχνεύεται περίπου στο 80% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου και συνοδεύεται συνήθως από απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity – LOH) και χρωμοσωμικές ανακατανομές. Η χρωμοσωμική αστάθεια απορυθμίζει τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης με τη μεταβολή που προκαλεί στην ισορροπία των χρωμοσωμάτων. Οι αλλαγές που προκαλούνται χρωμοσωμικά είναι τόσο σε αριθμό όσο και σε δομή. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας ουσιαστικά σηματοδοτεί την απώλεια του φυσικού τύπου (wild type) κάποιων σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (όπως το APC, P53 και SMAD4) των οποίων η φυσιολογική δράση είναι να καταστρέφουν τον κακοήγη φαινότυπο και να διατηρούν τη χρωμοσωμική σταθερότητα κατά τη διαδικασία της αντιγραφής. [123-125] Στο σύνολό τους αυτές οι μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για τη χρωμοσωμική αστάθεια στους όγκους. [126] Η γενωμική ακεραιότητα προστατεύεται από το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που εμποδίζει τα κύτταρα που έχουν υποστεί γενετικές βλάβες να πολλαπλασιαστούν περαιτέρω. Δίκλωνες θραύσεις στο DNA λόγω ιονίζουσας ακτινοβολίας ή ελευθέρων ριζών οδηγούν σε παύση του κύκλου ή απόπτωση. Οι παράγοντες που ενέχονται στο σύστημα ελέγχου του κύκλου είναι οι πρωτεΐνες TP53 και p21 όπως αναφέραμε και πιο πάνω (Kastan et al. 1991, Bunz et al. 1998, Rotman and Shiloh 1998, Morrison et al. 2000). Οι παράγοντες αυτοί είναι συχνά απορρυθμισμένοι στα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα αδρανοποίηση του TP53 σε ατελεύτητες κυτταρικές σειρές έχει σαν αποτέλεσμα τη χρωμοσωμική αστάθεια και τη δημιουργία μεταθέσεων, εξαλείψεων, χρωμοσωμικών δακτυλίων και συνενώσεων των χρωμοσωμικών άκρων. Μεταλλάξεις στο TP53 ευθύνονται και καταγράφονται στο 50% των σποραδικών κακοηθών όγκων. Σε αντίθεση με άλλους καρκίνους, ο καρκίνος του παχέος εντέρου δεν περιλαμβάνει γονιδιακή ανακατανομή.

3.2 Ελαττώματα στην επιδιόρθωση του DNA – Το Σύστημα Επιδιόρθωσης και Διατήρησης του DNA (mismatch repair system)

Στοιχεία του συστήματος επιδιόρθωσης (MMR) είναι συντηρημένα από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο. Απενεργοποίηση του μηχανισμού MMR (mismatch repair) οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας των μεταλλάξεων και συσσωρεύσής τους. Η αντιγραφή του γενετικού υλικού αποτελεί από τα βασικά χαρακτηριστικά της ζωής, πολλές φορές όμως συμβαίνουν λάθη κατά τη σύνθεση του DNA. Πολλά από αυτά τα λάθη διαφεύγουν από τον ενδογενή διορθωτικό μηχανισμό της αντιγραφής του DNA και απειλούν τη σταθερότητα του γονιδιώματος. Το σύστημα MMR της μετα-αντιγραφικής επιδιόρθωσης του DNA περιορίζει αυτά τα λάθη κατά 100 έως 1000 φορές. Στον άνθρωπο απώλεια στο σύστημα MMR, οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα καρκίνου. Κάποιες φορές υπάρχει απενεργοποίηση των γονιδίων επιδιόρθωσης (mismatch repair) η οποία μπορεί να είναι κληρονομούμενη όπως γίνεται στο HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) ή και επίκτητη όπως συμβαίνει σε όγκους με τη « σίγαση » - μετάλλαξη γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης (mismatch repair). [127-130] Η απώλεια της λειτουργίας των γονιδίων επιδιόρθωσης αναγνωρίζεται εύκολα με τη βοήθεια της μικροδορυφορικής αστάθειας αλλά και με ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Η γενωμική αστάθεια από την ανεπάρκεια των γονιδίων επιδιόρθωσης (mismatch repair) επιταχύνει την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου σε ασθενείς με HNPCC – ορισμένοι καρκίνοι εμφανίζονται μέσα σε 36 μήνες μετά από την τελευταία κολonosκόπηση της οποίας τα αποτελέσματα ήταν φυσιολογικά. [130] Η απενεργοποίηση των γονιδίων επιδιόρθωσης υπάρχει σε ποσοστό 15% σε μη οικογενείς καρκίνους παχέος εντέρου. Σε αυτούς τους ασθενείς συνήθως γίνεται μεθυλίωση του ενισχυτή του αντίστοιχου γονιδίου με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του (MMR loss). [130-133] Σε πρόσφατες μελέτες έχουν περιγραφεί πάνω από 130 γονίδια επιδιόρθωσης του DNA.

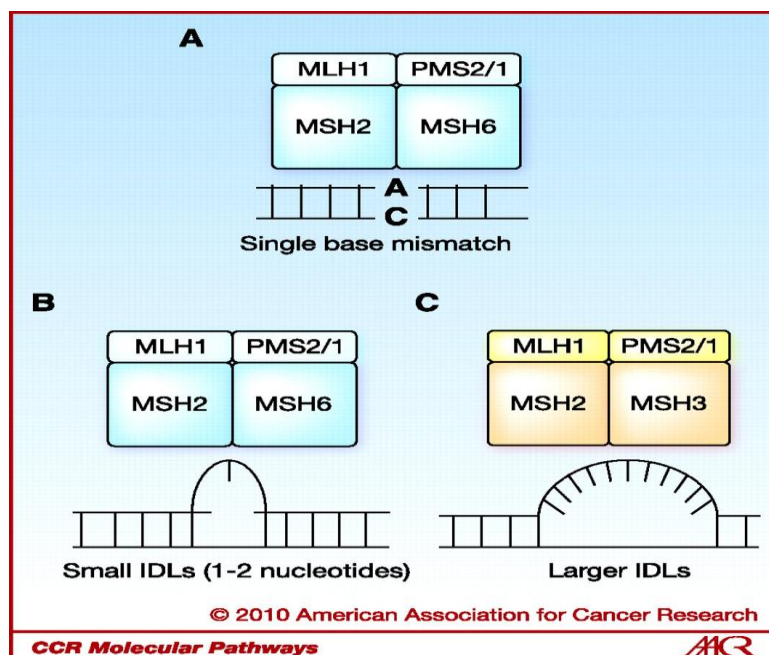
Με βάση όλα τα παραπάνω αντιλαμβανόμαστε πως η έρευνα στο σύστημα MMR έχει εξαιρετικά σημαντική βιοϊατρική χρησιμότητα. Το καλύτερα μελετημένο σύστημα είναι αυτό του βακτηρίου *Escherichia coli* που περιλαμβάνει τις ειδικές πρωτεΐνες MutS, MutL, MutH.

Το MMR γενικά απαιτεί δυο βασικά αναγνωριστικά βήματα:

1. Την αναγνώριση της βλάβης και
2. Την αναγνώριση της DNA αλυσίδας στόχου.

Η αναγνώριση της βλάβης πραγματοποιείται από τα ομόλογα MutS που προσδένονται σε λανθασμένα ζευγαρωμένες ή μη ζευγαρωμένες βάσεις και προσελκύουν άλλους επιδιορθωτικούς παράγοντες στο σημείο της βλάβης. Το δεύτερο αναγνωριστικό βήμα, η διάκριση της αλυσίδας, διαβεβαιώνει ότι η λανθασμένη ζευγαρωμένη βάση επιδιορθώνεται στη νεοσυντιθέμενη «θυγατρική» αλυσίδα που περιέχει το λάθος και όχι στην «πατρική» αλυσίδα. Το σύστημα MMR ενεργοποιείται όταν η MutS αναγνωρίζει και δένεται στην περιοχή του λανθασμένου ζευγαρώματος του DNA. Τα ευκαρυωτικά ομόλογα MutS (MSHs) σχηματίζουν διαφορετικά ετεροδιμερή που μπορούν να αναγνωρίσουν διαφορετικά υποστρώματα DNA και περιέχουν σχηματισμούς πρόσδεσης νουκλεοτιδίων.

Σχηματική απεικόνιση αναγνώρισης λάθους από τις πρωτεΐνες MMR-Συνεργασία μεταξύ ετεροδιμερών MutSa, MutSβ και MutL και άλλων σχετιζόμενων πρωτεϊνών για επιδιόρθωση των κακών ζεύξεων του DNA (American Association for Cancer Research 2010)



Η αναγνώριση της βλάβης του DNA μέσα στην έλικα σχετίζεται με το γεγονός ότι οι λανθασμένα ζευγαρωμένες βάσεις είναι χημικά μη διακριτές από τις φυσιολογικά ζευγαρωμένες και με αυτή τη λογική δεν μπορούν να αναγνωριστούν από την ειδική θέση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τόσο οι λανθασμένα ζευγαρωμένες όσο και οι μη ζευγαρωμένες βάσεις, αποσταθεροποιούν το δίκλωνο DNA και μια βασική παρατήρηση στις δομές των MutS- DNA είναι το χαρακτηριστικό τύλιγμα του DNA στην περιοχή του mismatch. Το MutS θα μπορούσε να χρησιμοποιεί αυτή την αποσταθεροποίηση του δίκλωνου DNA για να αναγνωρίσει διαφορετικούς τύπους λανθασμένου ζευγαρώματος με τη διευκόλυνση της ικανότητας να τυλίγουν το DNA και να διασπών τη συσσώρευση των βάσεων.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ Η ΑΡΧΗ ΤΟΥ MMR:

- 1) Αναγνώριση της βλάβης
- 2) Ξετύλιγμα έλικας (Ελικάση)
- 3) Αφαίρεση βλάβης (Ενδονουκλεάση)
- 4) Πολυμερισμός και συγκόλληση (Πολυμεράση και Λιγάση)

3.3 Παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο για ορισμένες ασθένειες που σχετίζονται με φαινοτύπους στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Η μεθυλίωση του DNA τροποποιεί την έκφραση του γονιδίου, αλλά δεν αλλάζει τις γενετικές πληροφορίες του κυττάρου. Κατά την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στην κυτοσίνη ενός μορίου DNA θα πρέπει το μόριο στο σημείο αυτό να ανοίξει τη διπλή του έλικα ώστε να προβάλλεται επί τα εκτός του νοητού κάθετου άξονα του μορίου η αζωτούχος βάση της κυτοσίνης.[134] Όταν η κυτοσίνη βρίσκεται στη θέση αυτή τότε το μόριο του DNA , έχει λάβει μια ευνοϊκή μορφή η οποία επιτρέπει έπειτα , να έρθει η μεθυλοτρανσφεράση (μεταφέροντας μαζί και την μεθυλομάδα) , να προσδεθεί στην κυτοσίνη και να την μεθυλιώσει. Στο φυσιολογικό γονιδίωμα η μεθυλίωση της κυτοσίνης πραγματοποιείται σε περιοχές επαναλαμβανόμενου DNA και όχι σε εξόνια.[134] Με την πρόσδεση αυτή δημιουργείται ένα σύμπλοκο της μεθυλοτρανσφεράσης με το μόριο του DNA γνωστό και με την ονομασία σύμπλοκο μεθυλοτρανσφεράσης – DNA. Η μεθυλίωση των υποκινητών επιφέρει γενικά μεταβολή στην δραστηριότητα των αντίστοιχων γονιδίων. Έτσι, η μεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα να λάβουν αυτά τη δομή της ετεροχρωματίνης και κατά συνέπεια , να υποκαθίστανται ανενεργά. Αυτή η απενεργοποίηση των γονιδίων αποτελεί μηχανισμό που έχει ανιχνευθεί σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. [134,135] Αντίθετα , υπομεθυλωμένα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου έχουν ως αποτέλεσμα, την υπερέκφραση αυτών (τα οποία είναι γνωστά και με την ονομασία πρωτοογκογονίδια). Συγκεκριμένα στο σποραδικό καρκίνο παχέος εντέρου που ο όγκος είναι μικροδορυφορικά ασταθής συνήθως μπλοκάρεται η έκφραση του MLH1, μέσω της υπερμεθυλίωσης του ενισχυτή. [134,135-137] Γενικά η μεθυλίωση είναι μια διαδικασία με τεράστιο ενδιαφέρον ενώ , πολλές πτυχές της παραμένουν ακόμη άγνωστες. Πειράματα που λαμβάνουν χώρα συνεχώς έχουν ως στόχο την πολύπλευρη ανάλυση και κατανόηση αυτού του φαινομένου.

3.4 Μικροδορυφόροι - Μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability)

Οι μικροδορυφόροι είναι μικρές, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα. Η επαναλαμβανόμενη φύση των μικροδορυφόρων στο γονιδίωμα τους καθιστά αρκετά ύποπτους για τα αντιγραφικά λάθη τα οποία προκαλούνται από τη διολίσθηση της DNA πολυμεράσης πάνω από τις συνεχόμενες ακολουθίες. Για πρώτη φορά η μικροδορυφορική αστάθεια και η σχέση της με οικογενείς και μη καρκίνους του παχέος εντέρου αναφέρεται το 1993. [129,138,139] Η πιο κοινή μικροδορυφορική αστάθεια στους ανθρώπους είναι η επανάληψη του δινουκλεοτίδιου CA, η οποία συμβαίνει δεκάδες χιλιάδες φορές σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Φυσιολογικά, αυτά τα λάθη στην αντιγραφή επισκευάζονται από τα γονίδια επιδιόρθωσης (MMR) αλλά κατά την απουσία τους οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες τα συσσωρεύουν. Έτσι ο αριθμός των καταλοίπων του DNA σε ένα μικροδορυφόρο μειώνεται ή αυξάνεται με αποτέλεσμα να δημιουργείται η μικροδορυφορική αστάθεια. Επομένως το MSI (μικροδορυφορική αστάθεια) ορίζεται ως οποιαδήποτε αλλαγή στο μήκος του καρκινικού DNA λόγω προσθήκης ή απαλοϊφής μίας ή περισσότερων νουκλεοτιδικών βάσεων σε ένα μικροδορυφόρο σε σύγκριση πάντα με το DNA του φυσιολογικό μικροδορυφόρου του ασθενή. Γενικότερα οι καρκίνοι του εντέρου μπορούν να διαχωριστούν βάση του ποσοστού MSI που παρουσιάζουν. Η μικροδορυφορική αστάθεια μπορεί είτε να είναι υψηλής συχνότητας, είτε χαμηλής ανάλογα με τον αριθμό των δεικτών που εμφανίζουν αστάθεια στον όγκο. Το 1997 δημιουργήθηκε από το National Cancer Institute (NCI) ένα «σύστημα» (Bethesda panel) που περιλαμβάνει πέντε (5) δείκτες για να χρησιμοποιείται στον καθορισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) στον καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC). [140-142] Η πεντάδα περιείχε 2 μονονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (BAT25 και BAT26) και 3 δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (D2S123, D17S250 και D5S346). Σε νεότερη μελέτη (Hamelin et. Al) θεωρήθηκε πως ένα σύστημα με 5 μονονουκλεοτιδικές αλληλουχίες δείχνει ευαισθησία και ακρίβεια στη μέθοδο ανίχνευσης μικροδορυφορικής αστάθειας κοντά σε ποσοστό 100%. [143-144] Όγκοι στους οποίους ένας μόνο δείκτης εμφανίζει αστάθεια χαρακτηρίζονται όγκοι με χαμηλή συχνότητα (MSI-L). Το αρνητικό στην MSI-L είναι πως πολλές φορές δεν ήταν ευδιάκριτη και μπορούσε να συγχυστεί με MSS (microsatellite stability). [145] Ενώ όγκοι με υψηλή συχνότητα χαρακτηρίζονται αυτοί στους οποίους δυο ή περισσότεροι δείκτες εμφανίζουν αστάθεια και αποτελούν

μια ιδιαίτερη ομάδα με διαφορετική πρόγνωση και ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία καθώς έχουν ιδιαίτερα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά (MSI-H). Έτσι ένας όγκος λέγεται ότι έχει υψηλό MSI (MSI-H) όταν παρατηρείται αστάθεια σε πάνω από το 30-40% των μικροδορυφόρων που εξετάζονται (συστήματα). Αντίστοιχα καρκίνοι με χαμηλό MSI (MSI-L) είναι αυτοί στους οποίους αστάθεια παρατηρείται σε λιγότερα από 30-40% των, ενώ καρκίνοι αρνητικοί για MSI (microsatellite stable - MSS) είναι αυτοί στους οποίους δεν παρατηρείται αστάθεια.

3.5 Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων από μεταλλάξεις

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια υπό φυσιολογικές συνθήκες όπως γνωρίζουμε αναστέλλουν την κυτταρική αύξηση. Τα κύτταρα διαθέτουν πολλά τέτοια γονίδια καθένα από τα οποία ενεργοποιείται από διαφορετικά ερεθίσματα του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν απενεργοποίηση αυτών των γονιδίων προάγουν την καρκινογένεση, βγάζοντας το κύτταρο εκτός ελέγχου.

Διακρίνονται σε:

1. **Gatekeepers**, γονίδια που κωδικοποιούν για ένα σύστημα ελέγχου που ισορροπεί μεταξύ κυτταρικής διαίρεσης και θανάτου.
2. **Caretakers**, γονίδια που ελέγχουν τη σταθερότητα του γονιδιώματος. Οι μεταλλάξεις τους στους καρκίνους προκαλούν γενετική αστάθεια με αυξημένο ρυθμό μεταλλαξογένεσης ή χρωμοσωμική αστάθεια.
3. **Landscapers**, γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που όταν μεταλλαχτούν συνεισφέρουν στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων καλλιεργώντας ένα περιβάλλον στρώμα, που συντελεί στην απορρυθμισμένη κυτταρική αύξηση.

Τα σημαντικότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια που σχετίζονται με ανάπτυξη Καρκίνου Παχέος Εντέρου

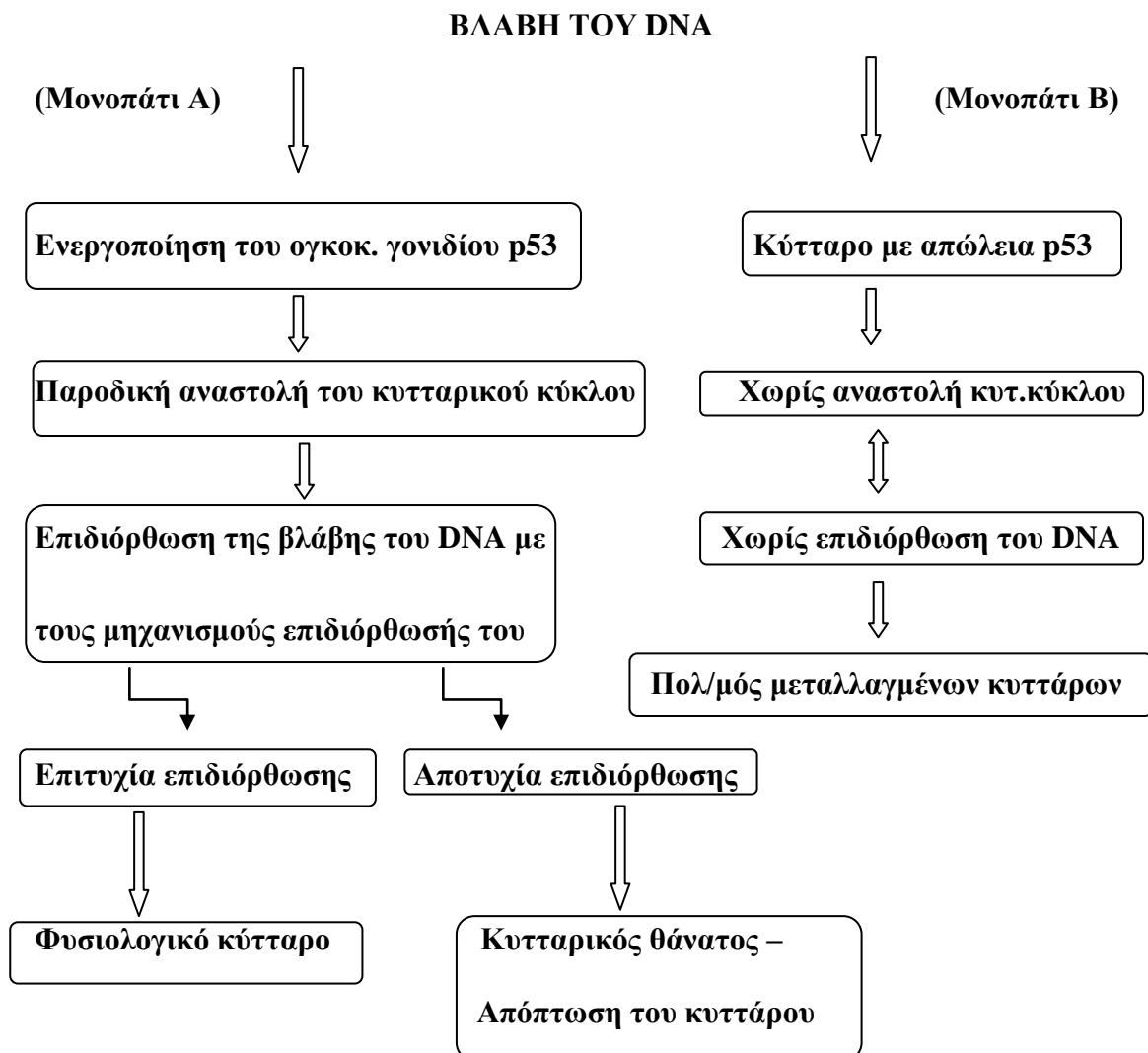
TP53: Η πρωτεΐνη p53 κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 (Tumor Protein 53) και εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος στο χρωμόσωμα 17 (17p13.1). Το φυσιολογικό γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 393 αμινοξέα που αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγει την επιδιόρθωση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Χαρακτηρίζεται και ως ο μοριακός «φύλακας» του γονιδιώματος, λόγω της σταθερότητας που καταφέρει να διατηρεί, προφυλάσσοντας επερχόμενες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα. Ο ρυθμιστικός ρόλος της πρωτεΐνης P53 οφείλεται στο ότι έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος καθορίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, γεγονός στο οποίο οφείλεται η ογκοκατασταλτική της δράση. Στα φυσιολογικά κύτταρα, τυχόν βλάβη του DNA του κυττάρου προκαλεί ενεργοποίηση και αύξηση της αποτελεσματικότητας του γονιδίου p53. Η σχέση μεταξύ βλάβης του DNA και αποτελεσματικότητας της πρωτεΐνης P53, ως μεταγραφικού παράγοντα, είναι ανάλογη. Σε συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου η πρωτεΐνη P53 δεν είναι απαραίτητη. Με την παρουσία βλάβης στο DNA, το γονίδιο p53 ενεργοποιείται και ρυθμίζει τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Προκαλεί, δηλαδή, παροδική αναστολή του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας το χρόνο στο κύτταρο είτε να επιδιορθώσει τη βλάβη του DNA με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσής του, είτε να οδηγηθεί σε απόπτωση. Αν το γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο, αποτυγχάνει να σταματήσει την ανάπτυξη των κυττάρων. Δηλαδή, υπάρχει αδυναμία ενεργοποίησης της ογκοκατασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης P53. Η αποτυχία πρόκλησης απόπτωσης είναι πιθανό να οδηγήσει σε ογκογένεση. Όγκοι αναπτύσσονται όταν μεταλλαχθεί σε κάποια κύτταρα και το δεύτερο αντίγραφο του TP53. [123-125, 149-151] Στους όγκους, η επαγωγή του γονιδίου p53 μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση, ίσως γιατί το φυσιολογικό p53 γρήγορα ενεργοποιεί το γονίδιο bax, το οποίο πυροδοτεί τη διαδικασία της απόπτωσης. Η πρωτεΐνη Bax σχηματίζει ετερομερή με την πρωτεΐνη Bcl-2, η οποία αποτελεί τον κρίσιμο καταστολέα της απόπτωσης και η αναλογία Bcl-2/Bax καθορίζει την επιβίωση ή το θάνατο των κυττάρων με απόπτωση. Χωρίς τη δράση της Bcl-2 ενεργοποιείται η απόπτωση και το κύτταρο αυτοκτονεί. [123,125] Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη P53 ενεργοποιεί το γονίδιο thrombospondin-1, το οποίο παράγει μια ανασταλτική πρωτεΐνη για την

αγγειογένεση. Συνεπώς, η έκφραση του γονιδίου p53 προλαβαίνει την αγγείωση των νεοσχηματισμένων καρκινικών ιστών. Η αποτυχία του μεταλλαγμένου γονιδίου p53 να ενεργοποιήσει το γονίδιο thrombospondin-1 μπορεί, επομένως, μερικώς να εξηγήσει γιατί η απώλεια της πρωτεΐνης P53 έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των καρκινικών κυττάρων η πρωτεΐνη P53 δεν είναι λειτουργική και αυτό είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων ή ελλειμμάτων στο γονίδιο p53. Έτσι, οι χημειοθεραπευτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται με σκοπό να πυροδοτήσουν την ενεργοποίηση του γονιδίου p53 είναι αναποτελεσματικές. Ακολουθεί σχηματικά ο ρόλος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53.

Ρόλος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53

A: Σε κύτταρα φυσιολογικά

B: σε κύτταρα με απώλεια του p53



TGF- β (Transforming growth factor beta): Το μονοπάτι του Transforming-Growth Factor beta είναι ένα από τα πιο πολύπλοκα και έχει βρεθεί να δρα άλλοτε ως ογκοκατασταλτικό και άλλοτε ως προαγωγό της κακοήθους εξαλλαγής. Περίπου στο 1/3 των Κ.Π.Ε. έχει απενεργοποιηθεί ο TGF-β. [152-156] Ο TGF-β (transforming growth factor-β) είναι μια κυτταροκίνη με πολλαπλές λειτουργίες στους ανθρώπινους ιστούς. Σήμερα, θεωρείται ότι ο TGF-β δρα ανασταλτικά στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης, ενώ σε πιο όψιμα στάδια τα καρκινικά κύτταρα καταφέρνουν να διαφεύγουν της ανασταλτικής του δράσης. Μεταλλάξεις που απενεργοποιούν το μονοπάτι TGF-β ευθύνονται για τη μετάβαση από αδένωμα σε υψηλού βαθμού δυσπλασία ή αδενοκαρκίνωμα. [157]

APC (Adenomatous Polyposis Coli): Το γονίδιο της οικογενούς πολυποδίασης του εντέρου, το APC εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 και η θέση του βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 5q21. [36-38] Το προϊόν του φυσιολογικού γονιδίου APC, μια μεγάλη πρωτεΐνη με 2843 αμινοξέα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσφυση (adhesion) των κυττάρων μεταξύ τους, στη μετανάστευση των κυττάρων, πιθανό και στην απόπτωσή τους. Υπάρχουν πολλές εντοπισμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό, οι περισσότερες των οποίων συμβαίνουν στα κωδικόνια 1286-1513. Απώλεια έκφρασης του APC δεν είναι αρκετή από μόνη της να προκαλέσει καρκίνο αλλά η πιο συνήθης μετάλλαξη που οδηγεί σε καρκινογένεση πραγματοποιείται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την APC. Η μετάλλαξη που δημιουργείται στο γονίδιο αυτό αποτελεί όμως το πρώτο στάδιο αφού έτσι προδιαθέτει το κύτταρο να υποστεί περαιτέρω γενετικές αλλαγές, οι οποίες αθροιζόμενες θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου. [158-164] Οι ασθενείς με FAP κληρονομούν ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του APC, ενώ αργότερα υφίσταται σωματική μετάλλαξη και το άλλο αλληλόμορφο του γονιδίου. Αφού απενεργοποιηθούν και τα δυο αλληλόμορφα του APC σε ένα κύτταρο του παχέος εντέρου, παρατηρείται επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η αδρανοποίηση και των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου APC, που προκαλείται από σωματικές μεταλλάξεις, φαίνεται ότι αποτελεί την πρωταρχική αιτία της απορύθμισης των κυττάρων των εντερικών κρυπτών που οδηγεί εντέλει στην καρκινογένεση. Αυτή η έλλειψη APC οδηγεί στη δημιουργία αδενωματούδους πολύποδα οι οποίοι έχουν μεγάλο ποσοστό εξαλλαγής σε αδενοκαρκίνωμα. Συγκεκριμένα για να αναπτυχθεί καρκίνος παχέος εντέρου απαιτούνται πολλές γενετικές αλλαγές, όμως υπάρχουν κάποια διεγερτικά μονοπάτια τα οποία έχουν δειχθεί ως υπεύθυνα για τη δημιουργία

όγκων. Ένα από αυτά τα μονοπάτια είναι και το Wnt (ομάδα μεταγωγής σήματος) το οποίο και ανακαλύφθηκε αρχικά λόγω της συμμετοχής του στην καρκινογένεση. Σε μοριακό επίπεδο η φυσιολογική δράση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το APC γονίδιο, σε συνεργασία με το ένζυμο glycogen synthase kinase-3 (GSK3) και τις axin proteins, ρυθμίζει τη συγκέντρωση της beta-catenin στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. [165] Η μετάλλαξη του APC γονιδίου καταλήγει στην παραγωγή μιας λειτουργικά μειονεκτικής πρωτεΐνης που αδυνατεί να ρυθμίσει τη συγκέντρωση της beta-catenin, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή της εντός των κυττάρων. [166-168] Η υπερσυσσώρευση της beta-catenin οδηγεί στη δημιουργία συμπλεγμάτων με τον επαγωγέα της αντιγραφής παράγοντα των T-κυττάρων (T-cell factor, Tcf), προάγοντας την αντιγραφή ποικίλων γονιδίων, όπως γονιδίων που διεγείρουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (c-MYC και cyclin D1) και γονιδίων που παράγουν εξωκυτταρικές πρωτεάσες (matrix metalloprotease 7), με τελικό αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της διήθησης και μετάστασης των κυττάρων. [123,125, 158-168]

DCC: Το γονίδιο DCC (Deleted in colorectal carcinoma) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 180kD περίπου, με εξωκυτταρικό, διαμεμβρανικό και ενδοκυτταροπλασματικό τμήμα. Η πρωτεΐνη εμπλέκεται στη διακυτταρική πρόσφυση (adhesion) και στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με το στρώμα. Από τα ανωτέρω το DCC φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη, στη διήθηση και στη μετάσταση των νεοπλασματικών κυττάρων. Πρώτη φορά ανακαλύφθηκε το 1990 μελετώντας περιστατικά Κ.Π.Ε.. Μία από τις πιο συχνές διαταραχές του γονιδίου αυτού παρατηρείται σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου και ορθού. Αποτελεί εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο σε αδενώματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονίδιο DCC παρεμβαίνει στα όψιμα στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης και συμβάλλει στην εξαλλαγή ενός καλοήθους νεοπλάσματος (του αδενωματούδους πολύποδα) σε κακόηθες, δηλαδή σε καρκίνο. Προκαλείται απώλεια ετεροζυγωτίας του DCC στην περιοχή 18q21. Οι διαταραχές του DCC προηγούνται κατά κανόνα αυτών του p53 και εμφανίζονται στο στάδιο των μεγάλων αδενωμάτων (προκαρκινικού σταδίου). Η αδρανοποίηση των γονιδίων αυτών, καθώς και κάποιων άλλων, άγνωστων ακόμη αντιογκογονιδίων, προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα τρομερό πλεονέκτημα αύξησης αλλά και ικανότητες διήθησης και μετάστασης, με

τελικό αποτέλεσμα την τοπική επέκταση σε παρακείμενα όργανα και τη δημιουργία μεταστάσεων σε απομακρυσμένα. [169-171]

3.6 Ενεργοποίηση Ογκογονιδίων που επιταχύνουν την ανάπτυξη του Καρκίνου

Παχέος Εντέρου

Εξέταση Ογκογονιδίου KRAS: Το KRAS αποτελεί μέλος μια οικογένειας γονιδίων που αποκαλούνται RAS πρωτοογκογονίδια (H-ras, N-ras και K-ras) και καθοδηγεί την παρασκευή μίας πρωτεΐνης, η οποία συμμετέχει αποφασιστικά στη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό τους, τη διαφοροποίησή τους, την απόπτωσή τους αλλά και την αγγειογένεση. [172,173] Η KRAS είναι μία πρωτεΐνη που στον ανθρώπινο οργανισμό κωδικοποιείται από το KRAS γονίδιο. Αν το KRAS γονίδιο υποστεί μετάλλαξη, τότε σαν ογκογονίδιο πλέον παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνων, όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Κ.Π.Ε.). Το K-RAS ανευρίσκεται μεταλλαγμένο περίπου στο 40% των καρκίνων του παχέος εντέρου με αποτέλεσμα να παραμένει συνεχώς ενεργό. [174] Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως όλα τα ενεργοποιημένα γονίδια περιέχουν σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του εξονίου 2 του γονιδίου K-RAS, συνηγορώντας υπέρ του ότι οι θέσεις αυτές μπορεί να είναι πολύ σημαντικές για τον φυσιολογικό έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων. [175-177] Το K-ras είναι μια πρωτεΐνη που παίζει βασικό ρόλο σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος (όπως το μονοπάτι Ras/MAPK) το οποίο βρίσκεται κάτωθι πολλών υποδοχέων αυξητικού παράγοντα, όπως ο EGFR, και εμπλέκονται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Το τελευταίο διάστημα μια εκτεταμένη ερευνητική δραστηριότητα σε ότι αφορά στο KRAS, οδήγησε στην διαπίστωση ότι η παρουσία μεταλλάξεων του αποτελεί ένα αρνητικό προβλεπτικό παράγοντα για τη δράση των διαφόρων αντι-EGFR θεραπειών. Η πρόσληψη του K-ras από το ενεργοποιημένο EGFR είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη ενδοκυττάρων ενζυμικών διαδικασιών από την κυτταρική επιφάνεια προς τον πυρήνα. Η παρουσία μεταλλάξεων στο KRAS έχει σαν συνέπεια την συνεχή ενεργοποίησή του η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση των διαφόρων μορίων των σηματοδοτικών μονοπατιών με τελικό αποτέλεσμα την κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων αυτών. Οι μεταλλάξεις του KRAS δεν συνυπάρχουν με μεταλλάξεις του EGFR ή του RAF, δεδομένου ότι με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία σε ένα μονοπάτι μετάδοσης σήματος δεν μπορούν να

συνυπάρχουν μεταλλάξεις σε περισσότερα του ενός επίπεδα (mutually exclusive). Κατά συνέπεια, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκφρασης του EGFR, η παρουσία μιας μετάλλαξης KRAS, συνδέεται με ενεργοποίηση του μονοπατιού μετάδοσης σήματος (Ras/MAPK). [178-179]

Εξέταση Ογκογονιδίου BRAF: Το BRAF είναι ένα ανθρώπινο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BRAF. Ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων RAF μαζί με τα γονίδια A-RAF και RAF1. Το γονίδιο BRAF βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 7q34. Η BRAF πρωτεΐνη εμπλέκεται και ενεργοποιεί σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κυττάρων, η αποστολή σημάτων στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία ανάπτυξης των κυττάρων. [178] Ορισμένες κληρονομικές BRAF μεταλλάξεις μπορεί να προκαλέσουν γενετικές ανωμαλίες. Μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια με δύο τρόπους. Πρώτον οι μεταλλάξεις που μπορεί να κληρονομηθούν και να προκαλέσουν γενετικές ανωμαλίες. Δεύτερον οι μεταλλάξεις που μπορεί να εμφανιστούν αργότερα στη ζωή και να προκαλέσουν καρκίνο ως ογκογονίδιο. Πάνω από 30 μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου που έχουν συσχετισθεί με ανθρώπινους καρκίνους έχουν εντοπισθεί. Συγκεκριμένα η μετάλλαξη V600E φαίνεται να είναι και η συχνότερη. Μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου έχουν βρεθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Λιγότερο από 1% των περιπτώσεων με BRAF μεταλλάξεις έχουν ταυτόχρονες RAS μεταλλάξεις και οι περιπτώσεις που έχουν μεταλλάξεις και στα δυο γονίδια, οι μεταλλάξεις BRAF είναι σχεδόν αποκλειστικά μη-V600E. [180-182] Τα γονίδια BRAF και KRAS είναι ισοδύναμα στις ογκογονικές δράσεις τους. Επίσης οι μεταλλάξεις BRAF είναι ανιχνεύσιμες ακόμα και σε μικρούς πολύποδες και έχουν συσχετισθεί και με πτωχή ανταπόκριση σε θεραπείες που στοχεύουν τον EGFR. [183]

PI3KGA: Η Κινάση 3 της Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI 3-κινάσες ή PI3Ks) ανήκει σε μια οικογένεια ενζύμων που εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η κινητικότητα, η επιβίωση και η ενδοκυτταρική επικοινωνία. Αυτές οι λειτουργίες με τη σειρά τους εμπλέκονται στον καρκίνο. Ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K που βασίζεται στην ενεργοποίηση του ομώνυμου μορίου PI3K έχει βρεθεί σε πληθώρα όγκων του ανθρώπου. Η κατηγορία A PI 3-κινάση p110α είναι μεταλλαγμένη σε

πολλές μορφές καρκίνου. Ως εκ τούτου, η δραστηριότητα της PI 3-κινάσης συμβάλλει σημαντικά στον κυτταρικό μετασχηματισμό και την ανάπτυξη του καρκίνου. Πρέπει να δημιουργηθούν σκευάσματα που θα ανταγωνίζονται το μονοπάτι PI3K και τη δραστηριότητά της και θα μειώνουν την επίδρασή της στον καρκινικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση. [184,185]

3.7 Παράγοντες Αύξησης

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor): Ο EGFR (HER-1) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και ειδικότερα μια τυροσινική κινάση, μέλος της οικογένειας HER η οποία εμπλέκεται σε πληθώρα κυτταρικών οδών, όπως κυτταρική αύξηση. [186] Εκφράζεται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων και αποτελεί τον πρώτο υποδοχέα αυξητικού παράγοντα που προτάθηκε ως στόχος αντικαρκινικής θεραπείας. Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR φωσφορυλιώνεται σε θέσεις τυροσίνης, έπειτα από πρόσδεση των συνδέσμων. Ενεργοποιεί τα μονοπάτια RAS-RAF-MER-MAPK και PI3K-AKt, τα οποία προάγουν τη μεταγραφή και προώθηση του κυτταρικού κύκλου το πρώτο (RAS-RAF-MER-MAPK) και την επιβίωση και αποφυγή απόπτωσης το δεύτερο (PI3K-AKt). [187] Η αυτοφωσφορυλλίωση του υποδοχέα οδηγεί σε ενεργοποίηση ενός καταρράκτη ενδοκυττάρων ενζυμικών διαδικασιών που οδηγούν τελικά σε αύξηση του πολλαπλασιασμού και αναστολή της απόπτωσης, σε αυξημένη κυτταρική κινητικότητα και τελικά στην εμφάνιση και πρόοδο του καρκίνου. Όσον αφορά τα καρκινώματα του παχέος εντέρου σε ορισμένες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι ο EGFR δείκτης σχετίζεται με καλή πρόγνωση ενώ σε άλλες δεν έχει αποδειχθεί καμία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του EGFR και της επιβίωσης. Επίσης έχει αναφερθεί σημαντική έκφραση του EGFR στους χαμηλής διαφοροποίησης και υψηλού σταδίου όγκους (στάδιο της νόσου και πιθανότητα υποτροπής). Η υπερέκφραση του EGFR και ο ενεργός του ρόλος στις πολλές και σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες/λειτουργίες οδήγησε στη δημιουργία χημικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν στο εξωκυττάριο τμήμα του EGFR, με αποτέλεσμα την αναστολή σύνδεσης με τους προσδέτες, καθώς και αναστολέων της τυροσινικής δράσης του ενδοκυττάρια τμήματος του EGFR μορίου. [188,189]

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) : Ο VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας) είναι μια κυτοκίνη και αποτελεί ρυθμιστή της αγγειογένεσης. Η

αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων και κυρίαρχο ρόλο κατέχει η οικογένεια του VEGF. [190] Η έκφραση του VEGF γενικά είναι δείκτης κακής πρόγνωσης σε πολλούς τύπους νεοπλασμάτων και αναφέρεται σε ορισμένες μελέτες ότι εκφράζεται στα υψηλού σταδίου καρκινώματα του παχέος εντέρου. Η έκφραση του VEGF εξαρτάται σημαντικά και από τον EGFR (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας) και από διάφορες ορμόνες όπως η ινσουλίνη, η τεστοστερόνη, η προγεστερόνη. [191,192]

PDGF (Plateled Derived Growth Factor) : Ο PDGF αποτελεί αυξητικό παράγοντα που παράγεται από τα αιμοπετάλια των θηλαστικών μετά από βλάβη κάποιου ιστού. Ο PDGF επιδρά σε ένα και μόνο τύπο κυττάρων, τους ινοβλάστες, πυροδοτώντας την αύξηση και διαίρεσή τους. Οι ινοβλάστες συμμετέχουν στο σύστημα επούλωσης τραυμάτων. Η σχέση του PDGF με την επαγωγή της ογκογένεσης αποδείχθηκε εισάγοντας το κλωνοποιημένο γονίδιο του PDGF σε ένα τύπο κυττάρου που δεν παράγει κανονικά PDGF(π.χ. ινοβλάστες). Η εκτοπική έκφραση του PDGF μετέτρεψε τα κύτταρα αυτά σε καρκινικά. [193,194]

Προσταγλαδίνη: Οι προσταγλαδίνες είναι βιοχημικά λιπίδια γνωστά για τις ισχυρές φυσιολογικές ιδιότητές τους. Παράγονται από αραχιδονικό οξύ και ανήκουν στην υποκατηγορία των λιπιδίων γνωστές ως εικοσανοειδή λόγω των δομικών ομοιοτήτων με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα 20 ανθράκων. Οι προσταγλαδίνες είναι ενεργές για μικρή χρονική περίοδο πριν μετατραπούν σε μη-ενεργή μορφή και ακολούθως αποβληθούν από το σώμα. Η σύνθεση των προσταγλαδινών λαμβάνει μέρος στις μεμβράνες διαφόρων κυττάρων. Τα μετατρεπτικά ένζυμα των κυκλοοξυγενασών (Cox) εμπλέκονται στην παραγωγή των προσταγλαδινών. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι υπάρχουν δύο μορφές των παραπάνω ενζύμων οι οποίες επιπλέον κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές του σώματος : Cox-1 (στομάχι Γ.Σ., νεφρούς, αιμοπετάλια) και Cox-2 (οστά, εγκέφαλος, αναπαραγωγικό σύστημα και στην δημιουργία της αίσθησης του πόνου κλπ).[196] Γενικά, δρουν με παρόμοιο τρόπο όπως οι ορμόνες, με τη διαφορά όμως ότι παράγονται και δρουν τοπικά στο σημείο που εμφανίζεται κάποια βλάβη. Οι προσταγλαδίνες δεν έχουν όλες την ίδια δράση. Ενώ οι προσταγλαδίνες τύπου 2 προάγουν την φλεγμονή, δυο άλλα γκρουπ, οι προσταγλαδίνες τύπου 1 και 3 φαίνεται να την μειώνουν. Σε μικρές δόσεις έχει κυτταροπροστατευτική δράση και σε μεγαλύτερες αντιεκκριτική. Φαίνεται πως στα νεοπλασματικά κύτταρα διαταράσσεται ο μηχανισμός ελέγχου παραγωγής και

αποδομήσεως των προσταγλαδινών. Οι προσταγλαδίνες θεωρούνται συγκαρκινογόνα ή προαγωγείς του όγκου, αλλά και αναστολείς καρκινογένεσης και συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Είναι γνωστό ότι βασική αιτία των βλαβών του γαστρικού βλεννογόνου που προκαλούν τα ΜΣΑΦ είναι η αντιπροσταγλανδινική τους δράση. Η παραγόμενη COX-2 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου λόγω του σημαντικού ρόλου που παίζει στην ανάπτυξη αδενωμάτων. Αυξημένα επίπεδα COX-2 συναντώνται στα 2/3 του καρκίνου του παχέος εντέρου. [195-197] Η PGE μπορεί να αποτελέσει μεγάλο ανασταλτικό παράγοντα για πολλές από τις λειτουργίες Β-λεμφοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων.

3.8 Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (Carcinoembryonic antigen-CEA)

Το CEA είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Φυσιολογικά εκφράζεται σε εμβρυικά κύτταρα του γαστρεντερικού και του ήπατος, αλλά η παραγωγή του σταματά πριν τη γέννηση. [198-199] Απουσιάζει από το αίμα των υγιών ενηλίκων, αν και τα επίπεδά του είναι αυξημένα σε καπνιστές. [200] Το CEA περιγράφηκε για πρώτη φορά από το 1965 από τους Phil Gold και Samuel O.Freedman σε εκχυλίσματα ιστών καρκίνου παχέος εντέρου το οποίο εκφράζεται και στο 95% περίπου των περιπτώσεων του ΚΠΕ. [201-203] Εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση και στην προστασία των καρκινικών κυττάρων κατά της απόπτωσης, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη δημιουργία μεταστάσεων του ΚΠΕ. Τα επίπεδα της CEA πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτης παρακολούθησης της πορείας της θεραπείας των ασθενών με ΚΠΕ. Έρευνες δείχνουν πως πτώση του επιπέδου της CEA κατά τη χημειοθεραπεία αυξάνει το προσδόκιμο επιβίωσης συγκριτικά με ασθενείς όπου οι συγκεντρώσεις CEA παραμένουν σταθερές ή μειώνονται ελάχιστα. [204,205]

3.9 Βλαστικά κύτταρα και Καρκίνος

Ο όρος “καρκινικό βλαστικό κύτταρο” προσδιορίζει το καρκινικό κύτταρο που έχει την ικανότητα να αυτο-ανανεώνεται και να δίνει ογκογόνα κύτταρα και την ικανότητα να διαφοροποιείται δημιουργώντας ένα πληθυσμό μη-ογκογόνων φαινοτυπικά διαφορετικών καρκινικών κυττάρων που συνιστούν το μεγάλο μέρος ενός όγκου. Μια από τις κλινικές εφαρμογές της θεωρίας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σχετίζεται με την ανάπτυξη μεθόδων ή ουσιών για την επαγωγή τελικής διαφοροποίησης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει εφικτό να απομονωθούν ώστε να μπορέσουμε να τα χρησιμοποιήσουμε για θεραπεία-διάγνωση. [206,207] Όπως και τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα, τα καρκινικά βλαστοκύτταρα βρίσκονται σε πολύ μικρό αριθμό, αλλά μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να γεννούν μεγάλο αριθμό απογόνων. Αντιθέτως, όμως, από τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα, τα καρκινικά βλαστοκύτταρα στερούνται των ελέγχων που τους λένε πότε να σταματήσουν να διαιρούνται. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα σκοτώνονται από τη χημειοθεραπεία, αν όμως κάποιο καρκινικό βλαστοκύτταρο επιβιώσει μετά τη θεραπεία, υπάρχει κίνδυνος επανεμφάνισης του καρκίνου. Η έρευνα των διαφορών της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των φυσιολογικών και των καρκινικών βλαστοκυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε θεραπείες που στοχεύουν στην αντιμετώπιση δηλαδή των καρκινικών βλαστοκυττάρων. [207] Στον ΚΠΕ τα καρκινικά βλαστοκύτταρα διαθέτουν την εξαιρετική ικανότητα να αυτοανανεώνονται και πολύ εύκολα μπορούν να μετακινηθούν, συνηθέστερα στο ήπαρ όπου και δίνουν μετάσταση.[208-210] Μεγάλο πεδίο έρευνας αποτελεί η απομόνωση ατομικών καρκινικών βλαστοκυττάρων από ιστούς ΚΠΕ μιας και οι παράγοντες που ελέγχουν την ανάπτυξή τους ενδεχομένως να μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για πρόληψη και θεραπεία.

3.10 Γουανυλική κυκλάση - GCC (Guanylyl cyclase C-GCC)

Η γουανυλική κυκλάση (GCC) είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας της λαχνοειδο-διαχωριστικής μεμβράνης που εκφράζεται επιλεκτικά από τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του εντέρου (από το δωδεκαδάκτυλο έως το ορθό), συμπεριλαμβανομένων των φυσιολογικών εντερικών κυττάρων και των κυττάρων ΚΠΕ. Η γουανυλική κυκλάση δεν εκφράζεται από εξωεντερικούς ιστούς και όγκους. [211] Το mRNA της GCC ανιχνεύεται σε όλες τις περιπτώσεις ΚΠΕ που

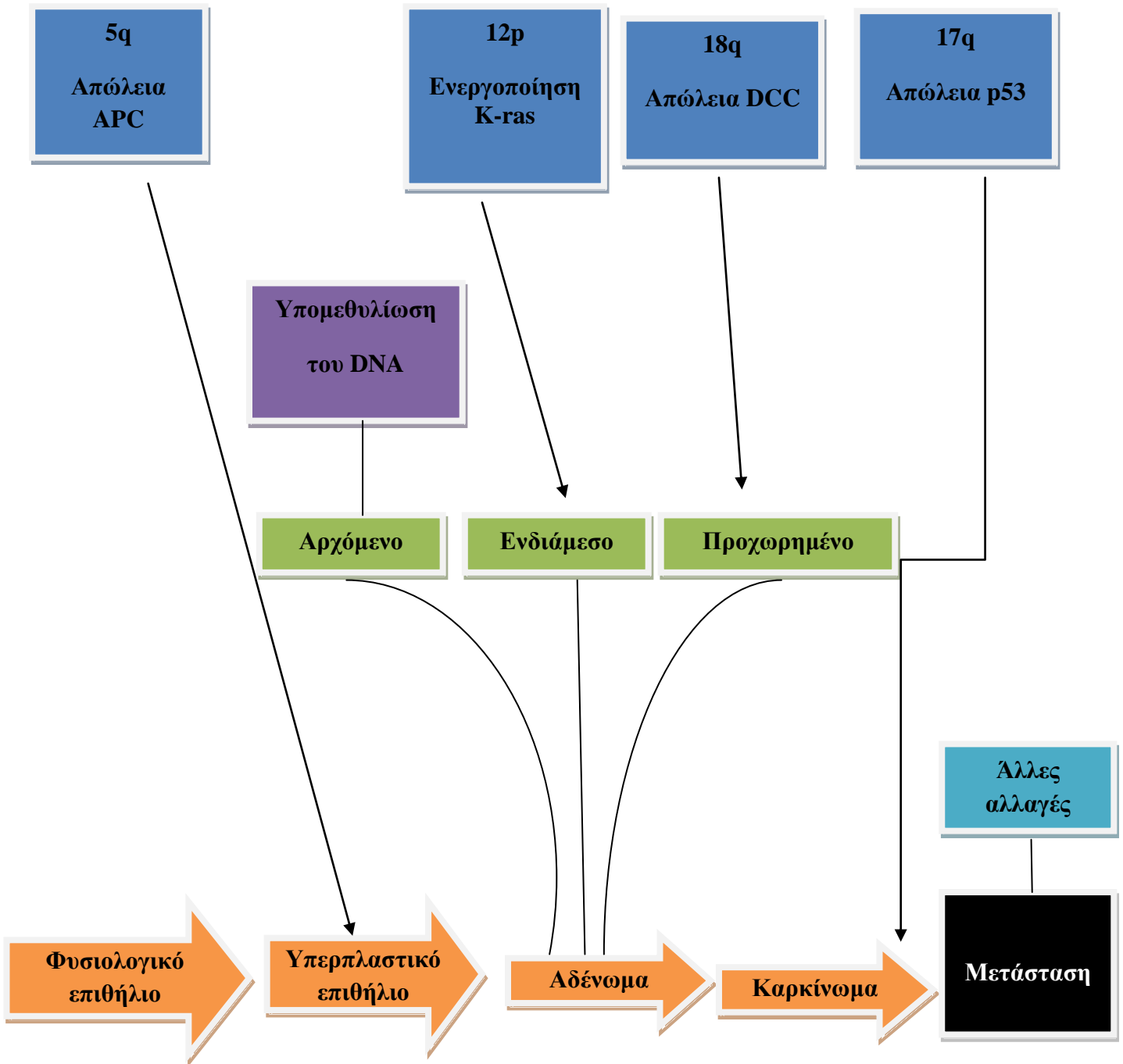
έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα. Επίσης έχει αναφερθεί ότι το mRNA της GCC ανιχνεύει λεμφαδενικές μεταστάσεις ΚΠΕ και ότι η ανίχνευσή του στους λεμφαδένες σχετίζεται με υποτροπή της νόσου και θνησιμότητα. [212] Οι Carrithers et al. (1996) εφαρμόζοντας RT-PCR και ανάλυση κατά Northern βρήκαν ότι η GCC εκφράζεται στο αίμα κάποιων από τους ασθενείς με ΚΠΕ σταδίου Dukes' B και σε όλους τους ασθενείς με ΚΠΕ σταδίων Dukes' C και D, ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφραση σε κανένα από τα δείγματα ελέγχου. [211] Γενικά η GCC θεωρείται ως ένας πολλά υποσχόμενος δείκτης για τη σταδιοποίηση του ΚΠΕ. Η ειδικότητα που παρουσιάζει η έκφραση του mRNA της GCC θα μπορούσε να παρέχει μια απάντηση στο πρόβλημα των λανθασμένων θετικών αποτελεσμάτων.

4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Πρόδρομος βλάβη του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου θεωρείται το αδένωμα. Το αδενοκαρκίνωμα αποτελεί το πιο συχνό καρκίνωμα του παχέος εντέρου (98%). Στις περισσότερες περιπτώσεις προέρχεται από κάποιον αδενωμάτωση πολύποδα. Ο ορθοκολικός καρκίνος και η παθογένειά του έχουν μελετηθεί περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο νεόπλασμα, λόγω της αυξημένης συχνότητας αλλά και της εύκολης προσέγγισης με το ενδοσκόπιο. Έτσι λοιπόν σύμφωνα με την πολυσταδιακή θεωρία «πολλαπλών χτυπημάτων» για την καρκινογένεση στο παχύ έντερο το κάθε στάδιο ανάπτυξης του ταυτοποιείται και η αυξανόμενη και προοδευτική συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων μας δείχνει σε μοριακό επίπεδο ότι το εκάστοτε στάδιο σχετίζεται με την κλινική και ιστοπαθολογική εξέλιξη η οποία ορίζεται ως «αλληλουχία αδενώματος-καρκινώματος». [10,213]

Η εξέλιξη του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου γίνεται μέσα από μια αλληλουχία μορφολογικά διακριτών αλλοιώσεων με την ακόλουθη σειρά: φυσιολογικό επιθήλιο, επιθηλιακή υπερπλασία, σχηματισμός αδενώματος με σταδιακή αύξηση και τελικά κακοήθης εξαλλαγή. Όλες αυτές οι μορφολογικές αλλαγές και αλλοιώσεις αναγνωρίζονται από ιστολογικές τομές ρουτίνας πολύ εύκολα και όπως έχουμε προαναφέρει σχετίζονται και με συγκεκριμένες μοριακές αλλαγές (απώλεια ή μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που διαδραματίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση, ενεργοποίηση του *ras* ογκογονιδίου σχετικά νωρίς κατά την αλλαγή της μορφολογικής αλληλουχίας αδενώματος-καρκινώματος, διαταραχές της μεθυλίωσης των μεθυλικών ομάδων του DNA και τελικά απώλεια ή/και αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων DCC και p53 πραγματοποιούνται αργά στη διαδικασία της καρκινογένεσης). Οι μοριακές αλλαγές απεικονίζονται στο κατωτέρω σχήμα. Δεν είναι απαραίτητο να λάβουν χώρα με τη συγκεκριμένη σειρά, αφού ούτως ή άλλως το σημαντικό είναι η συσσώρευση των μεταλλάξεων που δίνουν την ώθηση για τη διαδικασία της εξαλλαγής σε κακοήθεια και όχι η σειρά με την οποία συμβαίνουν. [10, 213]

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ



ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

5. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ MLH1, MSH2, MSH6 ΚΑΙ PMS2

Στο σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (mismatch repair system – MMR) εμπλέκονται κάποια γονίδια τα οποία κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τέσσερα γονίδια και τη σχέση τους με τον ΚΠΕ, τους υπερπλαστικούς και τους αδενωματώδεις πολύποδες. Τα μελετηθέντα γονίδια είναι τα MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2. Όπως έχουμε προαναφέρει η πρώτη αναφορά του συστήματος επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA έγινε λόγω της ανακάλυψης της αιτίας του κληρονομικού μη πολυποδιασικού ορθοκολικού καρκίνου (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC). Λέγοντας αιτία εννοούμε την ανακάλυψη ότι για το HNPCC ευθύνονται οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις. [214,215]

Παραθέτουμε στον παρακάτω πίνακα τη χρωμοσωμική εντόπιση των ανωτέρω γονιδίων .

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Γονίδιο	Χρωμοσωμική εντόπιση
MLH1	3p21-p23
MSH2	2p31
MSH6	2p21
PMS2	7p22

5.1 Αναλυτικά το κάθε ένα γονίδιο ξεχωριστά:

MLH1: το γονίδιο MLH1 (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 -E. Coli-) το οποίο εδράζεται στο μικρό βραχίονα του τρίτου χρωμοσώματος στη θέση 3p21-p23 και είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση πρωτεΐνης που είναι σημαντική για την επιδιόρθωση του DNA. Συγκεκριμένα βοηθά στην επιδιόρθωση βλαβών κατά την αντιγραφή του DNA και προετοιμάζει το μετέπειτα διαχωρισμό των κυττάρων. Η MLH1 πρωτεΐνη ενώνεται με την PMS2 (προϊόν του PMS2 γονιδίου) και σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Αυτό το σύμπλοκο συντονίζει τις δραστηριότητες άλλων πρωτεϊνών που επισκευάζουν λάθη κατά την αντιγραφή του DNA. Οι επιδιορθώσεις λαμβάνουν χώρα με την αφαίρεση τμημάτων DNA με λανθασμένη αλληλουχία και την αντικατάστασή τους με τμήμα DNA σωστής αλληλουχίας. Περίπου στο 50% των περιπτώσεων με HNPCC υπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο MLH1. Ασθενείς με HNPCC έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου, ωοθηκών, ήπατος, στομάχου και λεπτού εντέρου. Οι γονιδιακές μεταλλάξεις στο MLH1 στην περίπτωση του HNPCC, είτε εμποδίζουν πλήρως την κωδικοποίηση της MLH1 πρωτεΐνης, είτε οδηγούν στη δημιουργία μιας άλλης εκδοχής της πρωτεΐνης η οποία δε λειτουργεί σωστά. Έτσι κατά αυτόν τον τρόπο έχουμε υπερσυσσώρευση λαθών κατά τη διάρκεια της αντιγραφής που μένουν ανεπισκεύαστα. Αυτά τα λάθη πολλαπλασιάζονται κατά την κυτταρική διαίρεση με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης όγκων στο παχύ έντερο ή και σε άλλο όργανο. [216-220] Επίσης η απενεργοποίηση του MLH1 θεωρείται η συχνότερη αίτια της μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA.

MSH2: το γονίδιο MSH2 (mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 -E. Coli-) παρέχει «οδηγίες» για την σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης για την επιδιόρθωση του DNA και εδράζεται στο μικρό βραχίονα του δεύτερου χρωμοσώματος. Η παραχθείσα πρωτεΐνη επιδιορθώνει τυχόν σφάλματα στην αντιγραφή του DNA πριν την προετοιμασία της κυτταρικής διαίρεσης. Η MSH2 με τη σειρά της ενώνεται με τις MSH6 και ενίοτε την MSH3 και δημιουργούν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Αυτό το σύμπλοκο αναγνωρίζει περιοχές στο DNA που έχουν πραγματοποιηθεί λάθη κατά την αντιγραφή και στόχος είναι η διόρθωσή τους. Αρκετές εκατοντάδες μεταλλάξεων πάνω στο γονίδιο MSH2 έχουν αναφερθεί σε ποσοστό περίπου 40% στον HNPCC. Και στην περίπτωση του MSH2, οι μεταλλάξεις

οι οποίες συμβαίνουν είτε εμποδίζουν πλήρως την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης, είτε οδηγούν στη δημιουργία μιας άλλης εκδοχής της πρωτεΐνης η οποία δε λειτουργεί σωστά με αποτέλεσμα την υπερσυσσώρευση των λαθών στην αντιγραφή του DNA και την υπέρμετρη αύξησή τους κατά την κυτταρική διαίρεση με ενδεχόμενο υψηλού ρίσκου καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και επακόλουθα σε άλλα όργανα . [219-225]

Γενικά, αναγνώριση μεταλλάξεων στα γονίδια MLH1 και MSH2 καλύπτει το 50% των κλινικά αναγνωριζόμενων περιπτώσεων του συνδρόμου HNPCC. Τα συγκεκριμένα γονίδια αναφέρονται και σε άλλα παραδείγματα καρκίνου, όπως αυτό στον καρκίνο του ενδομητρίου με απώλεια της MLH1 συχνότερα.

Επίσης, μελέτες σε φορείς μεταλλάξεων του MLH1 και του MSH2 έδειξαν ότι μπορεί να έχουμε απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών ακόμα και σε άτυπη υπερπλασία αρκετό καιρό πριν από τη διάγνωση καρκινώματος. Για ακόμα μια φορά μας αποδεικνύεται πόσο χρήσιμη μέθοδο ελέγχου αποτελεί η ανοσοϊστοχημική ανάλυση των πρωτεϊνών αυτών.

MSH6: Το γονίδιο MSH6 (mutS homolog 6) όπως και τα δυο προαναφερθέντα (MLH1 και MSH2) είναι κι αυτό υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της αντίστοιχης πρωτεΐνης η οποία αποτελεί κι αυτή μέρος του MMR (mismatch repair system). Εδράζεται στο μικρό βραχίονα του δεύτερου χρωμοσώματος. Η MSH6 βοηθάει στην επιδιόρθωση λαθών που πραγματοποιούνται κατά την αντιγραφή του DNA πριν την κυτταρική διαίρεση. Η MSH6 ενώνεται με την MSH2 και δημιουργούν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Αυτό το σύμπλοκο αναγνωρίζει περιοχές του DNA που έχουν υποστεί λάθη κατά την αντιγραφή. Μεταλλάξεις στο γονίδιο MSH6 αναγνωρίζονται στο 10% περιπτώσεων του HNPCC. Όταν η MSH6 απουσιάζει πλήρως ή είναι μη λειτουργική ή μερικώς λειτουργική ο αριθμός των λαθών που παραμένουν αδιόρθωτα κατά την αντιγραφή του DNA αυξάνεται κατακόρυφα. Έτσι δημιουργείται συσσώρευση λαθών με ενδεχόμενο ρίσκο ανάπτυξης ΚΠΕ και άλλων καρκίνων όπως ωοθηκών, ήπατος, στομάχου και λεπτού εντέρου. Συνηθέστερο φαινόμενο σε γυναίκες ασθενείς με HNPCC και με μετάλλαξη στο γονίδιο MSH6 είναι η ανάπτυξη καρκίνου του ενδομητρίου. [220,221,223,226-228]

PMS2: Το γονίδιο PMS2 (PMS2 postmeiotic segregation increased 2 -S. Cerevisiae-) εδράζεται στο μικρό βραχίονα του έβδομου χρωμοσώματος. Κι αυτό το γονίδιο με τη σειρά του βοηθάει στην επιδιόρθωση των λαθών κατά την αντιγραφή του DNA πριν τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης. Όπως έχουμε προαναφέρει το PMS2 δημιουργεί ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με το MLH1 το οποίο συντονίζει τις δραστηριότητες άλλων πρωτεϊνών που επιδιορθώνουν τα λάθη που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Οι επιδιορθώσεις λαμβάνουν χώρα με την αφαίρεση τμημάτων DNA με λανθασμένη αλληλουχία και την αντικατάστασή τους με τμήμα DNA σωστής αλληλουχίας. Μεταλλάξεις στο γονίδιο PMS2 αναφέρονται σε ποσοστό 2% στο HNPCC με αναγνωρισμένη γονιδιακή μετάλλαξη. Ο τρόπος ανάπτυξης καρκίνου από συσσώρευση μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή και έπειτα κυτταρική διαίρεση είναι ίδιος για το PMS2, όπως και με τα υπόλοιπα τρία (MLH1, MSH6 και MSH2) προαναφερθέντα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MMR) όσον αφορά τον κίνδυνο για το παχύ έντερο αλλά και για τα υπόλοιπα όργανα (ενδομήτριο, ωοθήκες, ήπαρ, στόμαχος και λεπτό έντερο). Υπάρχει ανεπαρκής ή και καθόλου επιδιόρθωση των λαθών. [221,223,229-232]

5.2 Μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) και γονίδια επιδιόρθωσης (MMR)

Η μικροδορυφορική αστάθεια αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό των αναπτυσσόμενων όγκων σε φορείς μεταλλάξεων των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA. Με απλά λόγια αποτελεί το χαρακτηριστικό γνώρισμα του ελαττωματικού DNA MMR γονιδίου. Παρατηρείται στο 20-45% των όγκων και χαρακτηρίζεται από μεταβολές στην αλληλουχία του DNA κατά τη διαδικασία της αντιγραφής. Όταν οι μεταβολές αυτές συμβούν σε περιοχές του γονιδιώματος που χαρακτηρίζονται από επαναλαμβανόμενη αλληλουχία βάσεων (μια έως τέσσερις βάσεις), τότε μιλάμε για «μικροδορυφορική αστάθεια». Πρόκειται για μικρές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή, και είναι συνήθως προσθήκες ή απαισιωφές μίας ή δυο νουκλεοτιδικών βάσεων με συνηθέστερη την επανάληψη του δινουκλεοτίδιου CA, η οποία συμβαίνει δεκάδες χιλιάδες φορές σε ολόκληρο το γονιδίωμα . [139-145] Ως συχνότερη αίτια αυτής της «αστάθειας» του DNA δεικνύεται να αποτελεί η απενεργοποίηση του γονιδίου επιδιόρθωσης MLH1. Όπως αναφέραμε παραπάνω οι όγκοι που αναπτύσσονται σε άτομα οικογενειών με HNPCC προκαλούνται κατά κύριο λόγο από μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA (Mismatch Repair genes - MMR). Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια αναλογούν στο 90% περίπου των οικογενειών (50%, 40%, 7%-10%, 1%-2% αντιστοίχως) που έχουν κλινικά διαγνωστεί με σύνδρομο Lynch-HNPCC (Πίνακας 1). Σύμφωνα με μελέτες σπανιότερα ανιχνεύονται μεταλλάξεις και στα EPCAM γονίδια. Ένα συντριπτικό ποσοστό της τάξης του 70% - 85% των βλαβών που εντοπίζονται στα γονίδια επιδιόρθωσης είναι σημειακές μεταλλάξεις ενώ στο υπόλοιπο 15% -30% εντοπίζονται μεγάλες ελλείψεις ή διπλασιασμοί ολόκληρου μέρους των γονιδίων. Μεταλλάξεις είναι δυνατό να ανιχνευθούν σε όλο το μήκος των γονιδίων και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος όλων των εξωνίων και όχι μόνο μέρους τους. Για την επιλογή της κατάλληλης εργαστηριακής διαγνωστικής προσέγγισης και της σωστής ερμηνείας των αποτελεσμάτων από τον εργαστηριακό γενετιστή είναι απαραίτητο να παρέχονται από τον ιατρό όλες οι πληροφορίες του οικογενειακού ιστορικού του ασθενούς. Όπου αυτό είναι εφικτό, είναι προτιμότερο ο μοριακός έλεγχος για την ύπαρξη ή όχι κάποιας μετάλλαξης στα γονίδια αυτά να γίνεται αρχικά σε πάσχον μέλος της οικογένειας. Στην περίπτωση όπου δεν είναι εφικτός ο έλεγχος σε πάσχον

μέλος της οικογένειας, η μη ανίχνευση μετάλλαξης σε κάποιο από τα γονίδια σε υγιές μέλος της οικογένειας δεν συνεπάγεται πάντα απουσία κληρονομούμενης μετάλλαξης στην οικογένεια. Πρόσφατα άρχισε να εφαρμόζεται σε ειδικές περιπτώσεις μια νέας γενιάς μέθοδος, η οποία ονομάζεται Next Generation Sequencing (NGS) και είναι μια μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων νέας γενιάς, με την οποία είναι δυνατή η ανίχνευση πολλών γονιδίων συγχρόνως. [234-238] Η μέχρι σήμερα ‘κλασσική’ προσέγγιση για τη διάγνωση όλων των γενετικών νοσημάτων αφορούσε τη στοχευμένη διερεύνηση συγκεκριμένων γονιδίων (1-5), που εκτιμούσαμε ότι είναι δυνατό να σχετίζονται με τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Σήμερα πλέον, η τεχνολογία του NGS επιτρέπει τη μαζική ανάλυση όλων των ~22.000 γονιδίων του ανθρώπου (whole exome sequencing) ή ακόμα τη ταυτόχρονη ανάλυση εκατοντάδων γονιδίων (gene panels) που έχουν σχέση με διάφορες κατηγορίες νοσημάτων με γενετική αιτιολογία. Αναπτύσσονται λοιπόν νέα πρωτόκολλα ανίχνευσης ομάδων γονιδίων όπως αυτά για τον καρκίνο του παχέος εντέρου με 14 γονίδια (APC, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PTEN, SMAD4, STK11 και TP53). Ο έλεγχος για MSI γίνεται σύμφωνα με τα κριτήρια της Bethesda και είναι σημαντικό κριτήριο βάσει του οποίου επιλέγεται ο έλεγχος μεταλλάξεων στα MMR γονίδια. Για τη γενετική διερεύνηση ατόμων ύποπτων για σύνδρομο Lynch είναι τα γνωστά κριτήρια της Bethesda και τα κριτήρια του Amsterdam II. Τα μεν έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία, τα δε μεγαλύτερη ειδικότητα. [239] Γενικά τα νεοπλάσματα με υψηλή MSI αποτελούν πρόκληση λόγω του ότι αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα με ιδιαίτερα κλινικοπαθολογοανατομικά και μοριακά χαρακτηριστικά.

ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΜΕ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΜΗ ΠΟΛΥΠΟΔΙΑΣΙΚΟ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ (HNPCC)

Πίνακας 1

Γονίδιο MMR	Συχνότητα στο HNPCC
MLH1	50%
MSH2	40%
MSH6	7%-10%
PMS2	1%-2%

ΣΚΟΠΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανάδειξη της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA σε καλοήθη και κακοήθη νεοπλάσματα παχέος εντέρου. Οι πρωτεΐνες που μελετήσαμε είναι οι εξής τέσσερις: MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2. Εμπλέκονται στον ίδιο μηχανισμό επιδιόρθωσης (mismatch repair system, MMR) σε καλοήθεις αλλά και προκαρκινικές αλλοιώσεις του παχέος εντέρου. Διερευνήσαμε με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας την έκφραση των δεικτών και έγινε και η ανάλογη συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Αναλυτικότερα:

- ❖ Μελετήσαμε την έκφραση των πρωτεϊνών hMLH1, hMSH2, hMSH6 και hPMS2. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ιστούς και παρατηρήθηκαν οι αλλαγές της έκφρασης τους στην αλληλουχία φυσιολογικός ιστός – καλοήθεις παθήσεις – υπερπλαστικοί πολύποδες – αδενώματα – αδenoκαρκινώματα.

- ❖ Υπήρξε ένας μεγάλος αριθμός κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων που μελετήθηκαν οι οποίες ήταν:
 1. Ηλικία
 2. Φύλο
 3. Ιστολογικός τύπος
 4. Βαθμός κακοήθειας
 5. Το μέγεθος του όγκου
 6. Το στάδιο της νόσου
 7. Η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων
 8. Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Στο τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας και των ήδη δημοσιευμένων μελετών.

- ❖ Μελετήθηκε η σχέση των πρωτεϊνών και η μεταξύ τους αλληλεπίδρασή στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης.

- ❖ Μελετήθηκε και αξιολογήθηκε εάν η απουσία ή η παρουσία των πρωτεϊνών (και το ποσοστό παρουσίας τους) αυτών χαρακτηρίζει περισσότερο κάποια από τις ομάδες της αλληλουχίας φυσιολογικός ιστός – καλοήθεις παθήσεις – αδενώματα – αδενοκαρκινώματα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Επιλογή δείγματος

Η παρούσα μελέτη ήταν αναδρομική. Χρησιμοποιήθηκε το αρχειακό υλικό ασθενών του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Αναζητήθηκαν με προσοχή και συνέπεια μονιμοποιημένα δείγματα διαφόρων παθήσεων του παχέος εντέρου ώστε να καλύπτεται ένα μεγάλο ποσοστό των παθολογικών παθήσεων του οργάνου (στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένα δείγματα από υπερπλαστικούς πολύποδες, αδενωματώδεις πολύποδες και αδενοκαρκινώματα). Τα δείγματα τα οποία επιλέχθηκαν είχαν μονιμοποιηθεί με διάλυμα φορμόλης 10% και είχαν εγκλειστεί σε κύβους παραφίνης. Η αναζήτηση μας κάλυψε μια σχετικά μακρά χρονική περίοδο, τη χρονική περίοδο 2008-2010 ώστε τα δείγματα να διαφέρουν μεταξύ τους χρονολογικά και να καλυφθεί ένα ευρύ χάσμα ασθενών ηλικιακά. Το δείγμα συνολικά περιλάμβανε 80 περιστατικά. Από αυτά τα 80 περιστατικά υπήρχαν 9 υπερπλαστικοί πολύποδες, 21 αδενωματώδεις πολύποδες και 50 αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου εκ των οποίων το 1 αφορούσε σε μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κατηγορία αδενοκαρκινώματος που είχε αναπτυχθεί περιφερικά επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα. Όλα τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προέλθει από ενδοσκοπικές βιοψίες και προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις των ασθενών.

Για να λάβουμε τους σωστούς κύβους παραφίνης ανατρέξαμε στα αρχεία μας και έπειτα από προσεκτική παρατήρηση όλων των ιστολογικών τομών επιλέχθηκε ο πιο κατάλληλος κύβος για τον εκάστοτε ασθενή. Όλες οι ιστολογικές τομές ήταν χρωσμένες με αιματοξυλίνη-ιωσίνη. Επιλέχθηκαν οι κύβοι που αντιστοιχούσαν σε τομές στις οποίες ήταν καλά διακριτές τόσο η περιοχή του πολύποδα αλλά και του καρκινώματος αντιστοίχως. Σε ορισμένους ασθενείς αν δεν ήταν εφικτό και επαρκές τμήμα του όγκου ή και περίξ φυσιολογικός ιστός, χρησιμοποιήσαμε και έναν ακόμα κύβο παραφίνης ώστε να περιλαμβάνει και το μη διηθητικό στοιχείο.

- ❖ Στις καλοήθειες παθήσεις του παχέος εντέρου και στους αδενωματώδεις πολύποδες επιλέχθηκαν περιοχές που να έχουν ικανοποιητικό μέγεθος από τμήμα της αλλοίωσης και επίσης ικανοποιητικό τμήμα περίξ φυσιολογικού ιστού.

- ❖ Στα κακοήθη νεοπλάσματα (αδενοκαρκινώματα και αδενοκαρκίνωμα επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα) ,επιλέξαμε περιοχές που να έχουν ικανοποιητικό τμήμα του όγκου και περίξ φυσιολογικού ιστού και καρκίνωμα in situ.

Οι ιστολογικές τομές που παρουσίαζαν εκτεταμένες περιοχές νέκρωσης ή/και έντονης φλεγμονής απορρίφθηκαν κατευθείαν διότι δεν θα υπήρχε αποτελεσματική χρώση από τις τομές που θα παίρναμε και δεν θα ήταν δυνατή η οποιαδήποτε εξαγωγή συμπεράσματος. Από τον κάθε κύβο παραφίνης που χρησιμοποιήθηκε κόπηκαν σε μικροτόμο συνεχείς τομές ισόποσου πάχους 4μm η καθεμία. Η σειρά των ισόποσων τομών καταγράφηκε ώστε να είναι συνεχόμενες και να γνωρίζουμε την αντιστοιχία παρασκευάσματος -αριθμού τομών- ασθενούς. Περίπου από τον κάθε κύβο παραφίνης κοπήκαν 8 τομές ώστε να υπάρχει ποικιλία και βεβαιότητα και να μπορέσουμε να χρησιμοποιήσουμε και κάποιες τομές δοκιμαστικά στην αρχή πριν από την κύρια χρώση με τις πρωτεΐνες. Έπειτα η κάθε μια τομή τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες -πλακάκια- (Super-frost Plus, Menzel-Glaser, Germany) για να πραγματοποιηθεί η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών.

1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα – Ασθενείς

Όπως έχουμε αναφέρει καταγράφηκε η ηλικία, το φύλο, ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός της κακοήθειας, το μέγεθος του όγκου, το στάδιο της νόσου, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών, τα δείγματα των οποίων επιλέξαμε για την παρούσα εργασία, συλλέχτηκαν από το αρχειακό υλικό του εργαστηρίου της Παθολογικής ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Διατηρήθηκε πλήρης ανωνυμία των ασθενών ώστε να μην αποκαλυφθεί η ταυτότητά τους μέσω κωδικοποίησης των πληροφοριών σε αρχείο επεξεργασίας. Αναλυτικά τα δεδομένα των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη και οι διάφορες κατηγορίες καταγράφονται στους κάτωθι πίνακες.

Πίνακας 1. Ασθενείς με υπερπλαστικούς και αδενωματώδεις πολύποδες

Τύπος Αλλοίωσης	Ηλικία	Φύλο	Αριθμός Περιστατικών	Μέγεθος Πολύποδα
Υπερπλαστικοί Πολύποδες	40-79	6 Α 3 Θ	9	0,05 έως 1 εκατοστά
Αδενωματώδεις Πολύποδες	47-83	15 Α 6 Θ	21	0,2 έως 2,3 εκατοστά

Πίνακας 2. Ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου

Φύλο	30 Α 20 Θ
Ηλικία	48-89
Ιστολογικός Τύπος	49 Αδενοκαρκινώματα 1 Αδενοκαρκίνωμα επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα
Βαθμός Διαφοροποίησης	
I	15
II	28
III	7
Μέγεθος Όγκου	1 εκ. έως 4,8 εκ.
Λεμφαδενικές Μεταστάσεις	
Παρούσες	31
Απούσες	19
Στάδιο (κατά Dukes)	A: 4 B: 15 C: 24 D: 7

1.3 Περιγραφή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας

Η ανίχνευση των αντιγόνων στις τομές παραφίνης πραγματοποιείται εάν και μόνο το αντιγόνο προσδεθεί στο αντίστοιχο γι' αυτό αντίσωμα και μετά προσδεθεί σε αυτό ένας ιστοχημικά γνωστός δείκτης. Έτσι η χρώση του δείκτη μας αποκαλύπτει την παρουσία του αρχικού ζητούμενου αντιγόνου. Η ανοσοϊστοχημεία που έγινε, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του HRP-En Vision και τη μέθοδο της υπεροξειδάσης. Παρακάτω περιγράφουμε τα βήματα που ακολουθήθηκαν τα οποία και τυποποιήθηκαν για τα δείγματά μας με επανειλημμένες δοκιμές (standardization).

Αναλυτική περιγραφή των βημάτων της τεχνικής

- Τοποθέτηση πλακιδίων με τις τομές παραφίνης πάχους 4μm σε κλίβανο θερμοκρασίας 60° C για 24 ώρες για να αποξηραθούν.
- Αποπαραφίνωση με εμβύθιση των τομών σε ξυλόλη για 20 λεπτά
- Ενυδάτωση σε διαδοχικά αραιούμενα διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης (CH₃CH₂OH) και έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- Διαδικασία επεξεργασίας και αποκάλυψης του ζητούμενου αντιγονικού επιτόπου (antigen retrieval) με δυο διαφορετικές μεθόδους αναλόγως του χρησιμοποιούμενου αντισώματος. Οι τομές βυθίστηκαν σε διάλυμα υψηλού pH (high pH buffer) και έπειτα τοποθετήθηκαν στο φούρνο μικροκυμάτων σε ισχύ 800 W για δυο κύκλους των 5 λεπτών. Σε άλλη μέθοδο οι τομές εμβυθίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (citrate buffer). Έπειτα τοποθετήθηκαν και αυτές το φούρνο μικροκυμάτων σε ισχύ 300 W, για δυο κύκλους κι αυτοί με τη διαφορά ότι σε αυτή τη μέθοδο οι κύκλοι ήταν των 15 λεπτών.
- Τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα H₂O₂ σε απόλυτη μεθανόλη (CH₃OH) συγκέντρωσης 0.01M για 30 λεπτά για να πραγματοποιηθεί αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης.
- Ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Επικάλυψη της κάθε τομής με το αντίστοιχο αντίσωμα στην κατάλληλα αραιώση.
- Επώαση της επικαλυπτόμενης τομής για τον απαιτούμενο χρόνο.

- Ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Επικάλυψη των τομών με το δευτερογενές αντίσωμα HRP-En Vision και επώαση τους για 30 λεπτά σε θάλαμο υγρασίας σε θερμοκρασία δωματίου (25° C).
- Ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Εφαρμογή χρωμογόνου (διαμινοβενζιδιντετραυδροχλωρίδιο –DAB).
- Συνεχής έλεγχος των πλακιδίων με τις τομές σε κοινό μικροσκόπιο για την επίτευξη της εμφάνισης της ειδικής καφέ χρώσης των κυττάρων.
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- Τρίλεπτη χρώση των τομών με αιματοξυλίνη Harris.
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- Αφυδάτωση των τομών σε δοχεία διαδοχικώς αυξανόμενης συγκέντρωσης διαλύματος αιθυλικής αλκοόλης (CH₃CH₂OH).
- Έκπλυση των τομών σε ξυλόλη.
- Επικάλυψη των τομών.

Χρησιμοποιήσαμε τα παρακάτω αντισώματα

1. **Mismatch Repair Protein MLH1**, Clone ES05, NCL-L-MLH1 liquid, NOVOCASTRA-MENARINI, μέθοδος citrate buffer, σε αραιώση 1:100
2. **Mismatch Repair Protein PMS2**, Clone MOR4G liquid, NCL-L-PMS2, NOVOCASTRA-MENARINI, μέθοδος citrate buffer, σε αραιώση 1:100
3. **Mismatch Repair Protein MSH2**, Clone 25D12, NCL-MSH2, lyophilized, NOVOCASTRA-MENARINI, μέθοδος citrate buffer, σε αραιώση 1:40
4. **Mismatch Repair Protein MSH6**, Clone PU29, NCL-L-MSH6, liquid, NOVOCASTRA-MENARINI, μέθοδος citrate buffer, σε αραιώση 1:40

1.4 Μέθοδος αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των τεσσάρων δεικτών πραγματοποιήθηκε για όλες τις περιπτώσεις (φυσιολογικός ιστός, υπερπλαστικοί πολύποδες, αδενωμάτωσης πολύποδες, αδenoκαρκινώματα) από δυο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Οι προαναφερθέντες δεν γνωρίζανε τα δεδομένα αλλά και την έκβαση των ασθενών εκ των προτέρων. Τυχόν διαφορές στην αξιολόγηση ορισμένων πλακιδίων συζητήθηκαν και επανεξετάστηκαν από κοινού.

Παρακάτω παρουσιάζουμε τη μέθοδο μέτρησης της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA.

Όπως έχουμε αναφέρει εκτιμήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2. Η χρώση ήταν πυρηνική και η ένταση της βαθμολογήθηκε με τριβάθμιο σύστημα. Το σύστημα χωρίστηκε ως εξής: το 0 αντιπροσωπεύει την πλήρη απουσία χρώσης, το 1 την ασθενώς θετική χρώση, το 2 τη μετρίως θετική και το 3 την έντονα θετική χρώση. Ο βαθμός της ανοσοαντίδρασης των θετικών κυττάρων αξιολογήθηκε με βάση το τριβάθμιο σύστημα και το ποσοστό των κυττάρων στο οποίο παρατηρείται έκφραση της πρωτεΐνης. Το 0 ισούται από 0-10%, το 1 >50%, το 2 από 50-80% και το 3 >80%. (0, <50%=1, 50-80%=2 και >80%=3). Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτός ο τρόπος και αυτό το συγκεκριμένο σύστημα αξιολόγησης είναι γιατί κατά κοινή ομολογία χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των συγγενέστερων μελετών. Τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες τους αποτελούν ένα ευαίσθητο και αρκετά πολύπλοκο θέμα το οποίο αποτελεί σχετικά νέο πεδίο εξερεύνησης στη βιολογία του καρκίνου και χρήζει περαιτέρω μελέτης λόγω του ότι αποδεικνύεται εξαιρετικά βοηθητικό στο πεδίο της μοριακής βιολογίας και ιδιαίτερα στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Το συγκεκριμένο σύστημα το οποίο χρησιμοποιήσαμε είναι κοινά αποδεκτό στην επιστημονική κοινότητα λόγω της ευελιξίας του στην προσέγγιση του πλέον αξιόπιστου αποτελέσματος διότι οι άγνωστες πτυχές του πεδίου αυτού αποτελούσαν σημείο διαφωνίας μεταξύ των ερευνητών μέχρι τώρα. Τέλος, σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Τέτοιους

εσωτερικούς θετικούς μάρτυρες αποτέλεσαν τα παρακείμενα μη νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα, τα στρωματικά κύτταρα και τα λεμφικά κύτταρα.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

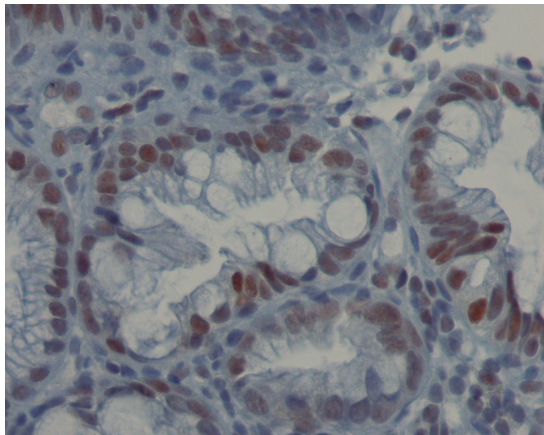
2.1 Υπερπλαστικοί πολύποδες του παχέος εντέρου

Μελετήσαμε την έκφραση των τεσσάρων γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 σε 9 περιπτώσεις υπερπλαστικού πολύποδα (καλοήθης πάθηση) του παχέος εντέρου οι οποίες προήλθαν από ενδοσκοπική εξαίρεση. Στις 9 αυτές περιπτώσεις οι 6 ασθενείς ήταν άρρενες (66.66%) και οι 3 θήλειες (33.33%). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 59.5 έτη (από 40 έως 79 ετών). Το μέγεθος των συλλεχθέντων πολυπόδων ήταν ποικίλο. Το μέγεθος του μικρότερου πολύποδα ξεκινούσε από 0,05 εκατοστά και το μέγεθος του μεγαλύτερου έφτανε μέχρι 1 εκατοστό (μέση τιμή 0,52 εκ). Η ανοσοχρώση για τις πρωτεΐνες στα φυσιολογικά κύτταρα (επιθηλιακά κύτταρα, στρωματικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες, ήταν πυρηνική. Έκφραση και των τεσσάρων πρωτεϊνών παρατηρήθηκε στο φυσιολογικό επιθήλιο και στα λεμφοκύτταρα. Δεν παρατηρήσαμε απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών σε καμία από τις 9 περιπτώσεις των καλοήθων πολυπόδων. Στις περιπτώσεις του υπερπλαστικού πολύποδα παρατηρήθηκε έντονη πυρηνική χρώση στο 100% στα τρία αντισώματα από τα τέσσερα που χρησιμοποιήσαμε. Τα τρία αυτά αντισώματα ήταν τα MLH1, MSH2 και PMS2. (Εικόνες 1-4) Στο τέταρτο αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε, το MSH6 τα επτά (7) από τα εννέα (9) πλακάκια είχαν έντονη πυρηνική χρώση στο 100% (=3 με βάση το τρίβαθμο σύστημα που χρησιμοποιήσαμε). Όμως δυο (2) από τα εννέα (9) (22.22%) εμφάνισαν πυρηνική χρώση στο 80% των επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 5). Και πάλι υπήρχε έκφραση της πρωτεΐνης MSH6 στα δυο αυτά παρασκευάσματα απλά ελαφρώς μικρότερη. Οι δυο αυτοί πολύποδες δεν διέφεραν από τους λοιπούς της μελέτης ούτε σε μακροσκοπικό επίπεδο ούτε και μικροσκοπικό επίπεδο. Παρακάτω ακολουθούν οι φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που αφορούν τους υπερπλαστικούς πολύποδες.

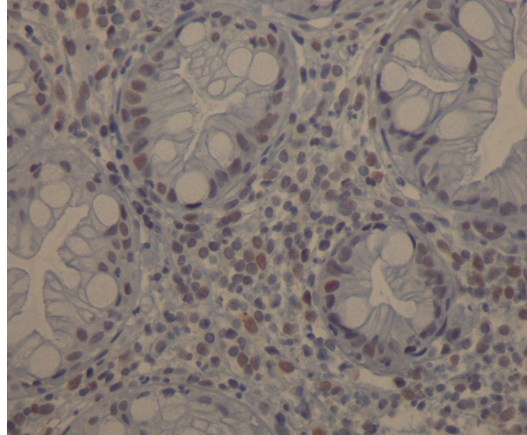
Εικόνα 1: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε υπερπλαστικό πολύποδα (DABx600)

Εικόνα 2: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH2 σε υπερπλαστικό πολύποδα (DABx400)

Εικόνα 1

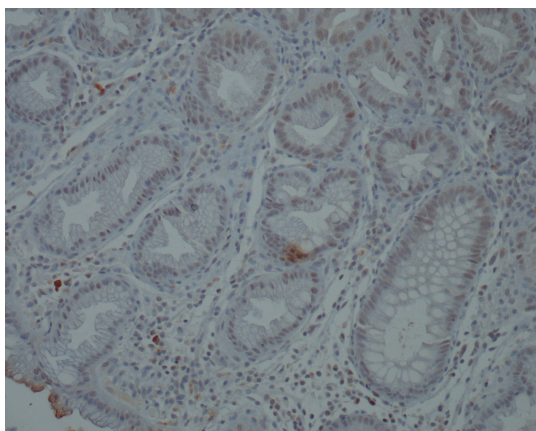


Εικόνα 2

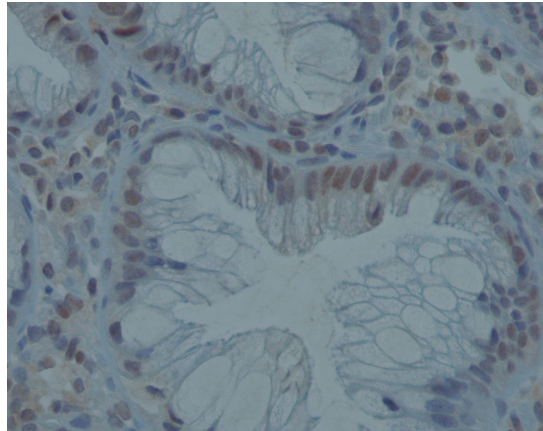


Εικόνα 3: A) Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 σε υπερπλαστικό πολύποδα (DABx200) **B)** Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 σε υπερπλαστικό πολύποδα (DABx600)

Εικόνα 3A

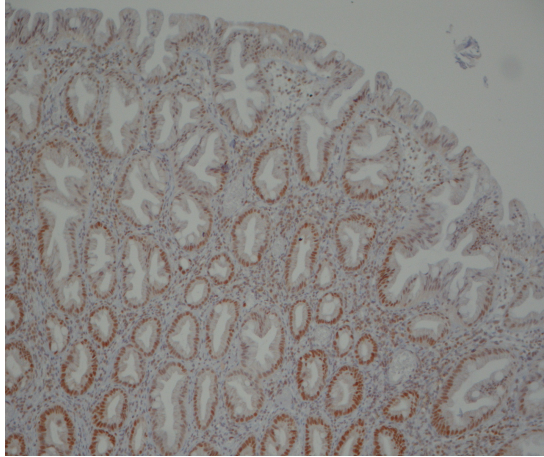


Εικόνα 3B

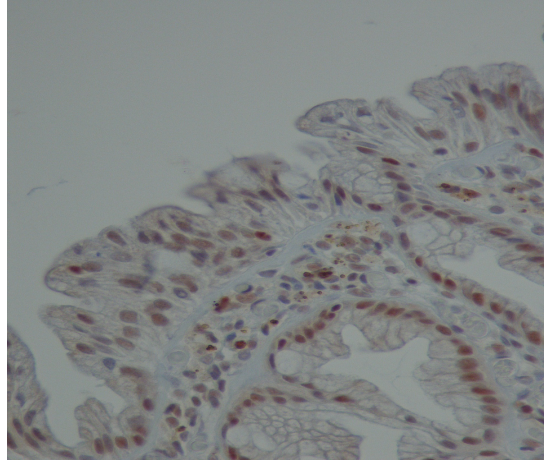


Εικόνα 4: **A)** Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε υπερπλαστικό πολύποδα (DABx100) **B)** Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε υπερπλαστικό πολύποδα (DABx400)

Εικόνα 4A

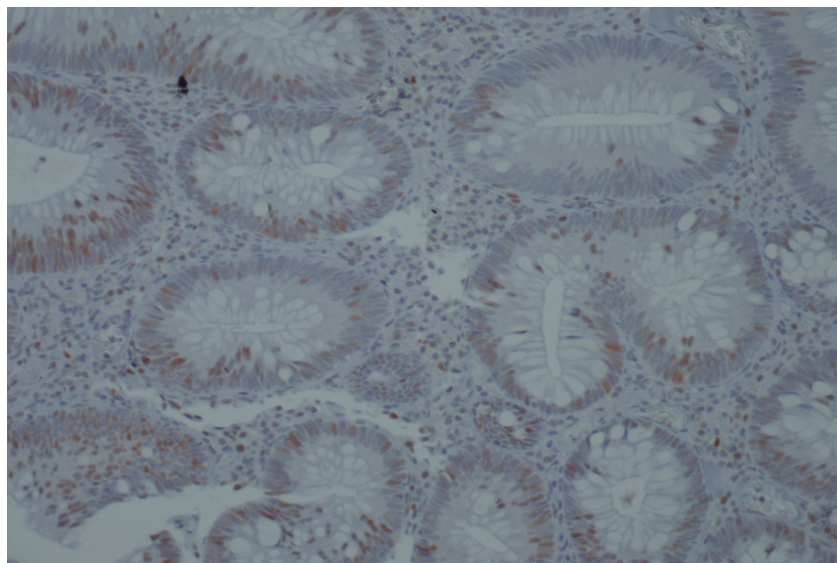


Εικόνα 4B



Εικόνα 5: Ποσοστιαία ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε υπερπλαστικό πολύποδα (DABx400)

Εικόνα 5



2.2 Αδενωματώδεις πολύποδες

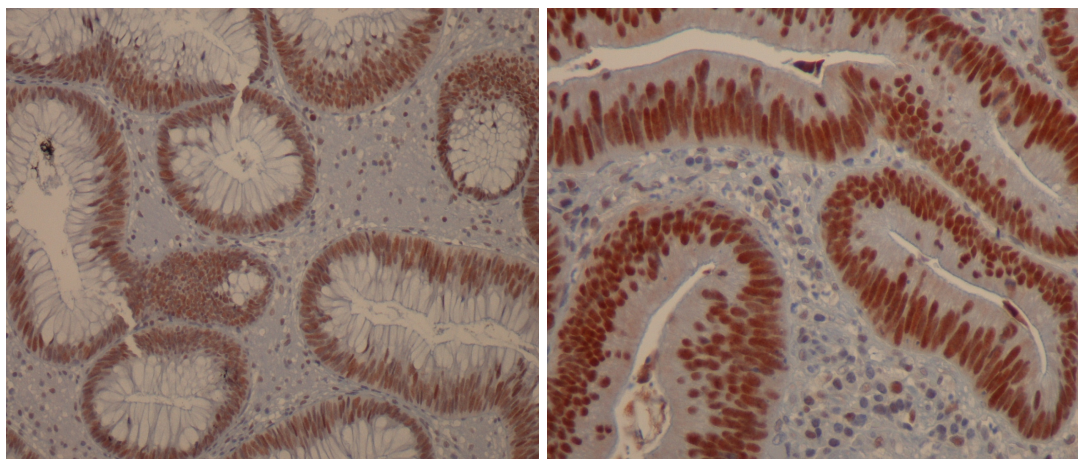
Στην εργασία μας είχαμε υπό μελέτη 21 περιπτώσεις αδενωματώδων πολύποδων. Μελετήσαμε την έκφραση των τεσσάρων γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA, MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 στις 21 περιπτώσεις αδενωματώδους πολύποδα του παχέος εντέρου οι οποίες προήλθαν από ενδοσκοπικές εξαιρέσεις και χειρουργικά παρασκευάσματα. Οι ασθενείς ήταν 15 άρρενες (71.42%) και 6 θήλεις (28.57%). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 65 έτη (από 47 έως 83 ετών). Από τους 21 αδενωματώδεις πολύποδες οι 16 ήταν σωληνολαχνωτοί, οι 4 μικτοί (υπερπλαστικοί και αδενωματώδεις) και υπήρχε και 1 serrated adenoma / “οδοντωτό αδένωμα”. Σε όλες τις περιπτώσεις αδενωμάτων που μελετήθηκαν η χρώση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης τόσο στα νεοπλασματικά όσο στα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήσαμε και ως εσωτερικούς θετικούς μάρτυρες, ήταν πυρηνική. Σε όλα τα φυσιολογικά επιθήλια του παχέος εντέρου παρατηρήθηκε έκφραση και των τεσσάρων πρωτεϊνών διατήρησης και επιδιόρθωσης του DNA. Όσον αφορά στις 21 περιπτώσεις των αδενωμάτων που μελετήθηκαν στα τρία από τα τέσσερα αντισώματα MLH1, MSH2 και PMS2 η πυρηνική χρώση ήταν έντονη και παρατηρήθηκε σε ποσοστό της τάξεως του 100% (=3 με βάση το τρίβαθμο σύστημα που χρησιμοποιήσαμε). Αυτό δείχνει πως όταν χρησιμοποιήσαμε τα τρία αυτά αντισώματα δεν υπήρχε απώλεια της έκφρασης, άρα εκφραζόταν και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες κανονικά στους αδενωματώδεις πολύποδες (Εικόνες 6-10). Για το αντίσωμα MSH6 η χρώση άγγιζε το ποσοστό του 100% στις 19 από τις 21 περιπτώσεις των αδενωμάτων. Στις υπόλοιπες δυο περιπτώσεις η ανοσοχρώση ήταν έντονη και εκφραζόταν σε ποσοστό 50%-80% σε σύγκριση με τα νεοπλασματικά κύτταρα (με βάση το τρίβαθμο σύστημα ήταν =2 τα δύο αυτά περιστατικά). Αλλά και πάλι παρατηρήθηκε έκφραση των πρωτεϊνών. Η μια από τις δυο περιπτώσεις αφορούσε σε σωληνολαχνωτό αδένωμα παχέος εντέρου και η άλλη σε serrated adenoma -οδοντωτό αδένωμα- (Εικόνα 11). Συμπερασματικά απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 στους αδενωματώδεις πολύποδες δεν αναδεικνύεται και αποτελεί εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο.

Εικόνα 6: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε σωληνολαχνωτό αδένωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 7: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε σωληνολαχνωτό αδένωμα παχέος εντέρου (DABx600)

Εικόνα 6

Εικόνα 7

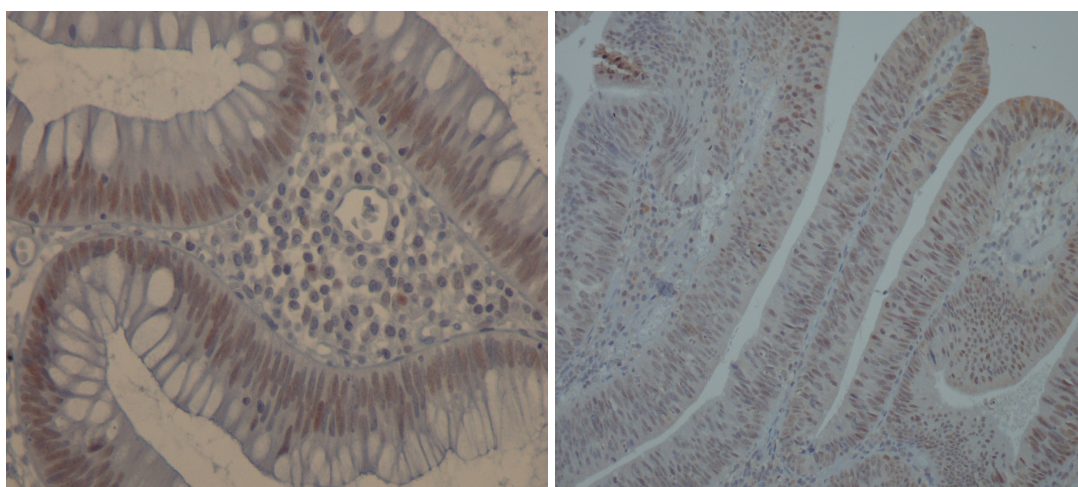


Εικόνα 8: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH2 σε σωληνολαχνωτό αδένωμα παχέος εντέρου (DABx400)

Εικόνα 9: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 σε σωληνολαχνωτό αδένωμα παχέος εντέρου (DABx200)

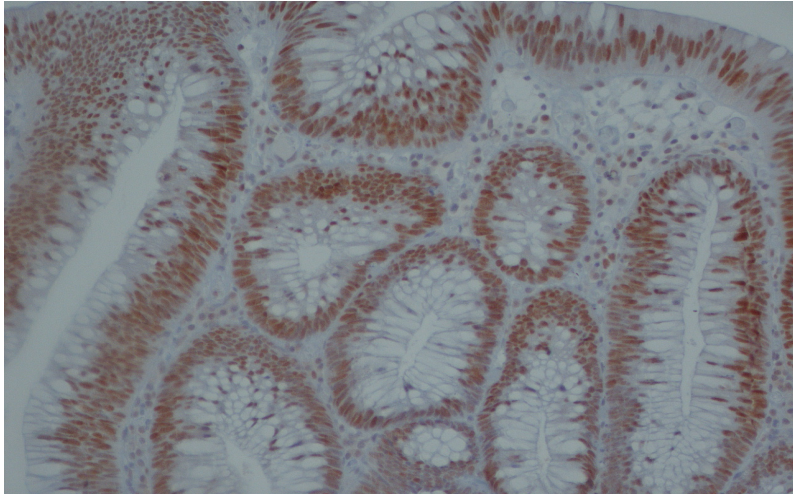
Εικόνα 8

Εικόνα 9



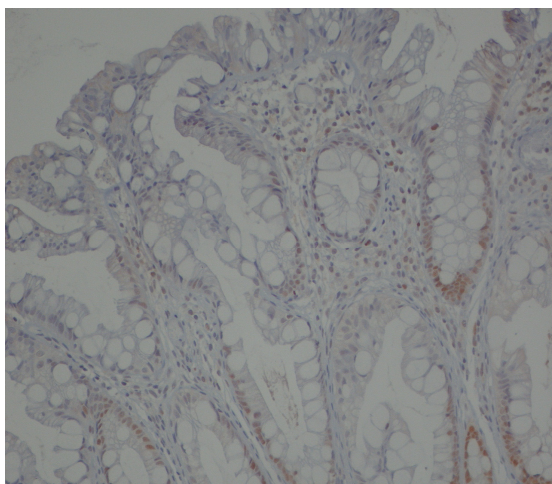
Εικόνα 10: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε σωληνολαχνωτό αδένωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 10

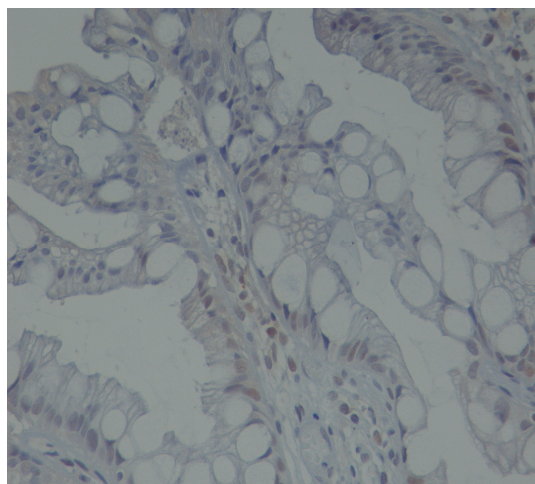


Εικόνα 11: **A)** Ποσοστιαία ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε οδοντωτό αδένωμα-serrated adenoma (DABx200) **B)** Ποσοστιαία ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε οδοντωτό αδένωμα-serrated adenoma (DABx400)

Εικόνα 11A



Εικόνα 11B



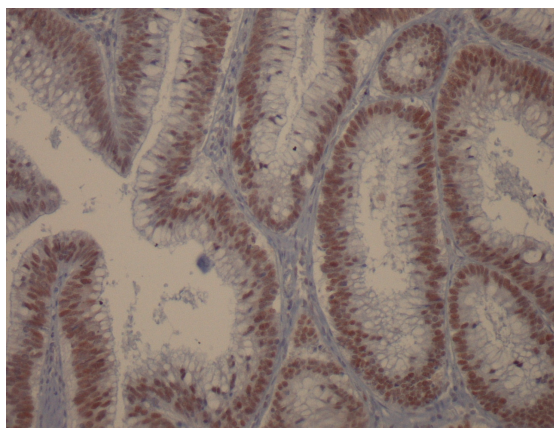
2.3 Αδενοκαρκίνωμα επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ένα περιστατικό από τα χειρουργικά παρασκευάσματα των συνολικά 50 αδενοκαρκινωμάτων που μελετήσαμε. Αυτά το περιστατικό παρουσιάζει αδενοκαρκίνωμα αναπτυχθέν επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα. Η ανοσοχρώση για το περιστατικό ήταν παρόμοια και με τα τέσσερα αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε, MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2. Μελετήθηκε η έκφραση της ανοσοχρώσης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης τόσο στα κύτταρα του αδενώματος όσο και στα κύτταρα του αδενοκαρκινώματος. Η χρώση ήταν έντονη πυρηνική. Ο ασθενής ήταν θήλυς (100%) και ο αδενωματώδης πολύποδας ήταν σωληνολαχνωτός. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το περιστατικό διότι παρουσιάζει όχι μόνο τα αναγνωρισμένα περιφερικά στοιχεία αδενωματώδους πολύποδα πλησίον του αδενοκαρκινώματος, αλλά το γεγονός πως ο αδενωματώδης πολύποδας εμφάνισε ασθενή ανοσοχρώση σε ποσοστό <50% των νεοπλασματικών κυττάρων στις δυο από τις τέσσερις πρωτεΐνες. Αναλυτικά για κάθε πρωτεΐνη, όταν πραγματοποιήθηκε χρώση του σκευάσματος με την MLH1 πρωτεΐνη δεν παρατηρήθηκε κάποια απώλεια/μείωση της έκφρασής της ούτε στον αδενωματώδη πολύποδα αλλά ούτε και στο διηθητικό αδενοκαρκίνωμα. (Εικόνες 12, 13) Τα ίδια αποτελέσματα πήραμε αντίστοιχα και από την εξεταζόμενη πρωτεΐνη MSH2 όσον αφορά τη διατήρηση της έκφρασής της στον αδενωματώδη πολύποδα και στο διηθητικό αδενοκαρκίνωμα. Για τις πρωτεΐνες MSH6 και PMS2 παρατηρείται μείωση της έκφρασης των εξεταζόμενων πρωτεϊνών και συγκεκριμένα μείωση κατά το ήμισυ με ασθενή ανοσοχρώση σε ποσοστό < 50% των νεοπλασματικών κυττάρων στον αδενωματώδη πολύποδα και πλήρη απουσία έκφρασης της MSH6 και της PMS2 μετέπειτα στο διηθητικό αδενοκαρκίνωμα (Εικόνες 14-17). Παρατηρούμε πως υπάρχει μείωση της έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA (MMRP) και συγκεκριμένα της έκφρασης των MSH6 και PMS2 στον σωληνολαχνωτό αδενωματώδη πολύποδα, γεγονός το οποίο δείχνει πως η μείωση αυτή πραγματοποιήθηκε σε κάποιο στάδιο στον αδενωματώδη πολύποδα σε πρώιμο στάδιο καρκινογένεσης πριν την ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος.

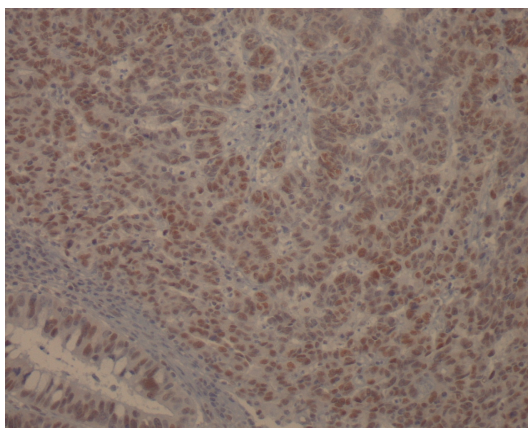
Εικόνα 12: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε σωληνολαχνωτό αδένωμα επί εδάφους του οποίου αναπτύχθηκε το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 13: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου επί εδάφους σωληνολαχνωτού αδενωματώδους πολύποδα (DABx200)

Εικόνα 12



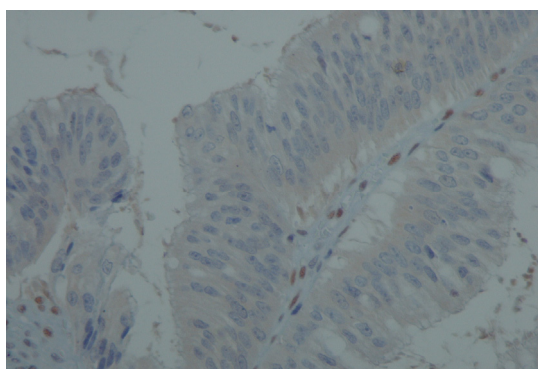
Εικόνα 13



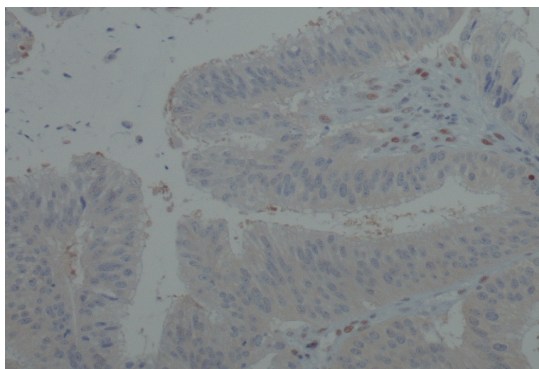
Εικόνα 14: Ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 στο σωληνολαχνωτό αδενωματώδη πολύποδα επί εδάφους του οποίου αναπτύχθηκε το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx400)

Εικόνα 15: Ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 στο σωληνολαχνωτό αδενωματώδη πολύποδα επί εδάφους του οποίου αναπτύχθηκε το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 14

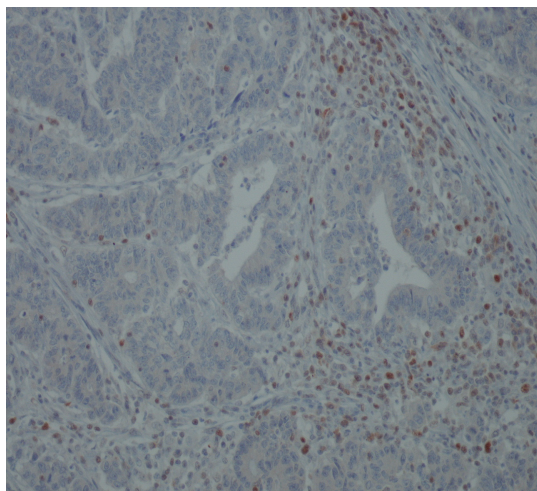


Εικόνα 15

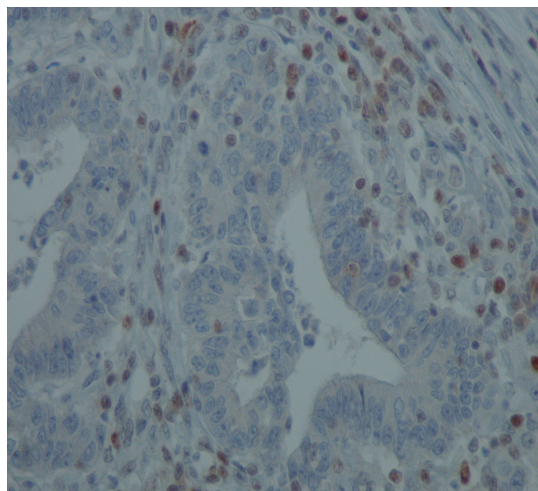


Εικόνα 16: **A)** Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου αναπτυχθέν επί εδάφους σωληνολαχνωτού αδενωματώδους πολύποδα (DABx200) **B)** Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου αναπτυχθέν επί εδάφους σωληνολαχνωτού αδενωματώδους πολύποδα (DABx400)

Εικόνα 16A

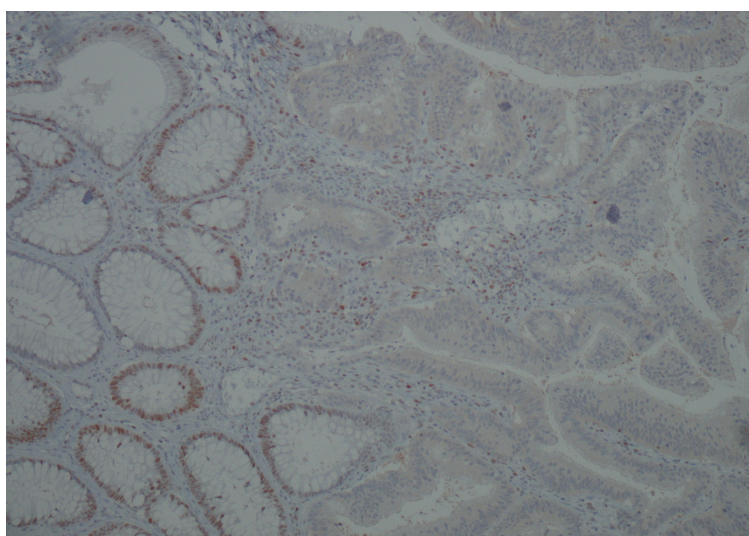


Εικόνα 16B



Εικόνα 17: Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου αναπτυχθέν επί εδάφους σωληνολαχνωτού αδενωματώδους πολύποδα (DABx100)

Εικόνα 17



2.4 Αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου

Εξετάσθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA συνολικά σε 50 περιστατικά από χειρουργικά παρασκευάσματα καρκίνου παχέος εντέρου και συγκεκριμένα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου. Από τα 50 αυτά περιστατικά τα 49 ήταν αδενοκαρκινώματα και 1 αδενοκαρκίνωμα που αναπτύχθηκε επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα (βλ. 3 Αδενοκαρκινώματα επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα). Από τα 49 περιστατικά (των 50 συνολικά) αδενοκαρκινώματος τα 35 ήταν άρρενες (71.42%) και τα 14 ήταν θήλεις ασθενείς (28.57%). Η ανοσοχρώση ήταν παρόμοια και με τα τέσσερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2. Σε όλες τις περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων που μελετήθηκαν η χρώση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA τόσο στα νεοπλασματικά όσο στα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήσαμε και ως εσωτερικούς θετικούς μάρτυρες, ήταν πυρηνική. Η εκτίμηση έγινε ημιποσοτικά, εκτιμώντας την ένταση της ανοσοχρώσης σε σχέση πάντα με το φυσιολογικό επιθήλιο-στρωματικά κύτταρα-φλεγμονώδη κύτταρα και το ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων. Στις 48 περιπτώσεις παρατηρήθηκε διατήρηση της έκφρασης και των τεσσάρων πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 (Εικόνα 18-21). Από τα υπόλοιπα δυο, το ένα αδενοκαρκίνωμα είναι αυτό που θα δούμε παρακάτω και το δεύτερο αυτό που μελετήσαμε ανωτέρω -το αδενοκαρκίνωμα που αναπτύχθηκε επί εδάφους του αδενωματώδους πολύποδα-. Παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 στο αδενοκαρκίνωμα σε ποσοστό 4% επί του συνολικού ποσοστού συμπεριλαμβανομένου και της απώλειας της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 του διηθητικού αδενοκαρκινώματος που αναπτύχθηκε επί εδάφους αδενωματώδους πολύποδα. Τα ίδια ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα προέκυψαν και από τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 στο παρόν περιστατικό. Παρατηρήθηκε πλήρης απουσία ανοσοχρώσης - έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 (επίσης 4% επί του συνολικού). Μείωση της έκφρασης της MLH1 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στο αδενοκαρκίνωμα με το ποσοστό αυτόματα να πέφτει στο 2% διότι στο αδενοκαρκίνωμα που αναπτύχθηκε επί εδάφους πολύποδα η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται κανονικά. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και από την ανοσοϊστοχημική εξέταση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH2 στο

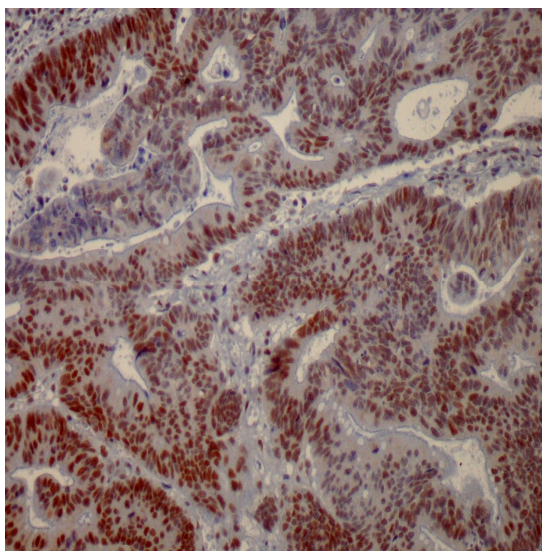
αδενοκαρκίνωμα (Εικόνα 22-24). Άρα παρατηρούμε μείωση της στο 1 αδενοκαρκίνωμα (2% επί του συνολικού ποσοστού). Υπήρξε δηλαδή ταυτόχρονη απώλεια της έκφρασης των δυο πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA (MSH6 και PMS2) στον ασθενή και μείωση της έκφρασης των άλλων δυο εξετασθέντων πρωτεϊνών (MLH1 και MSH2). Ο ασθενής ήταν άρρεν, σταδίου Dukes A και pT1N0M0 στο TNM αντίστοιχα. Στο συγκεκριμένο περιστατικό παρατηρούμε ταυτόχρονη απώλεια/μείωση έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης σε αρχικό στάδιο της καρκινογένεσης. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σύμφωνα με τη θεωρία πως η απώλεια των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) συμβαίνει κατά τα αρχικά στάδια της κακοήθους εξαλλαγής και όχι νωρίτερα, δηλαδή σε καλοήθεις όγκους ή σε προχωρημένα κλινικά στάδια της νόσου με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας. Επίσης το μέγεθος του αδενοκαρκινώματος αλλά ούτε και η ηλικία των ασθενών επηρέασε τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Τέλος στις λεμφαδενικές μεταστάσεις από τέσσερα αδενοκαρκινώματα παρατηρήθηκε διατήρηση της έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 (MMR) όπως και στην πρωτοπαθή εστία (Εικόνα 25). Δεν εξετάστηκαν όλες οι λεμφαδενικές μεταστάσεις ως εκ τούτου δεν είναι δυνατόν να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Παρακάτω ακολουθούν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες με φυσιολογική έκφραση των πρωτεϊνών και με μειωμένη έκφραση αντίστοιχα. Παρατηρούμε ίδια συσχέτιση απώλειας/μείωσης μεταξύ των ζευγών των πρωτεϊνών MSH6 - PMS2 και MLH1 - MSH2.

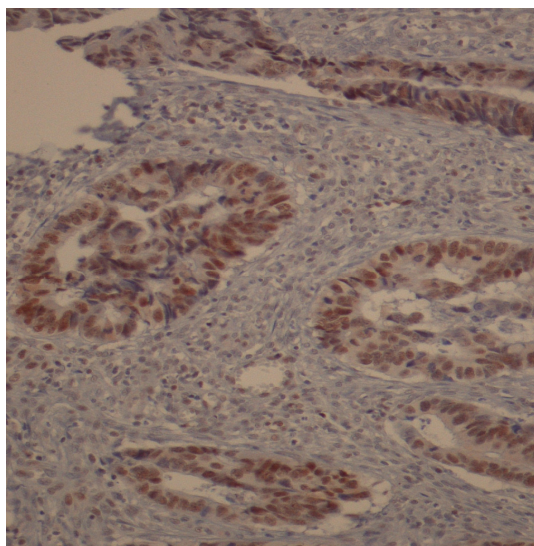
Εικόνα 18: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε διηθητικό αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 19: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 σε διηθητικό αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 18

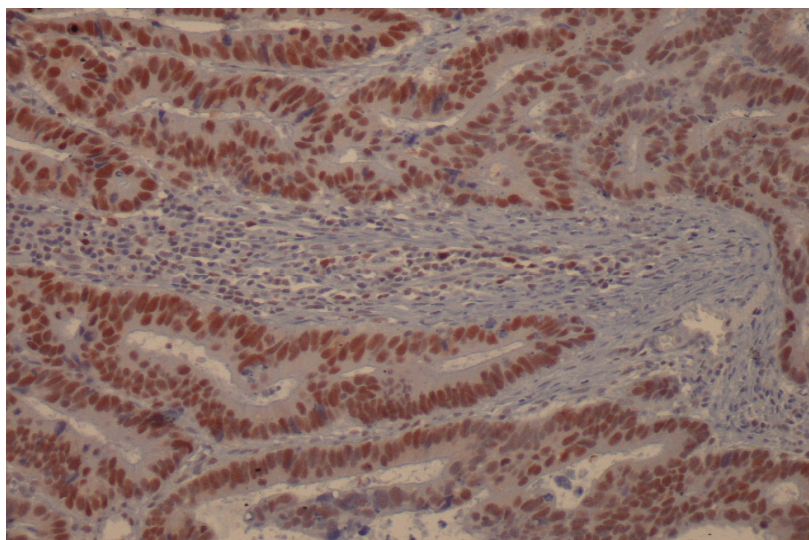


Εικόνα 19



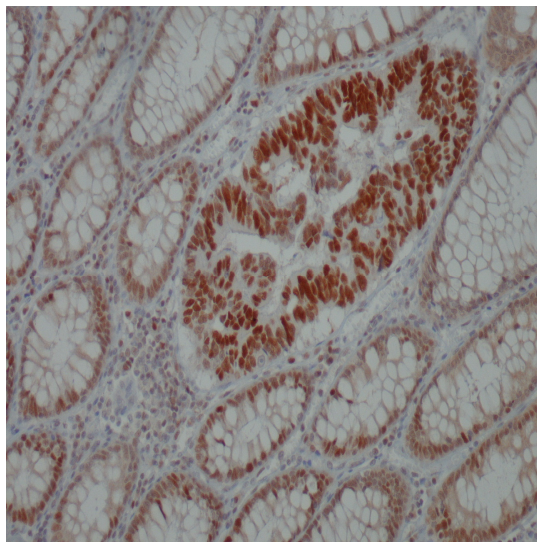
Εικόνα 20: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH2 σε διηθητικό αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 20

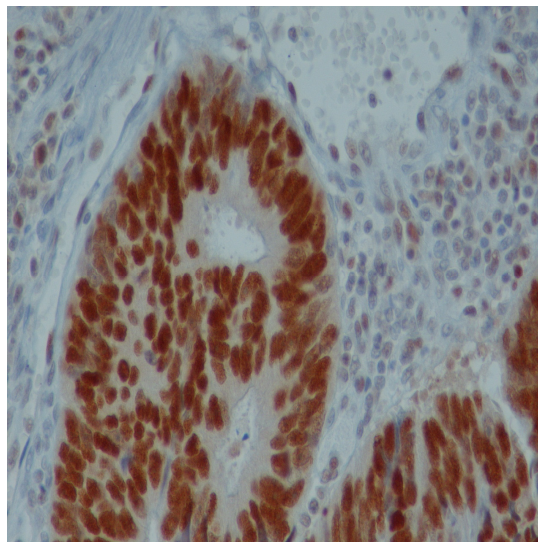


Εικόνα 21: Α) Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε διηθητικό αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx200) Β) Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε διηθητικό αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx400)

Εικόνα 21A

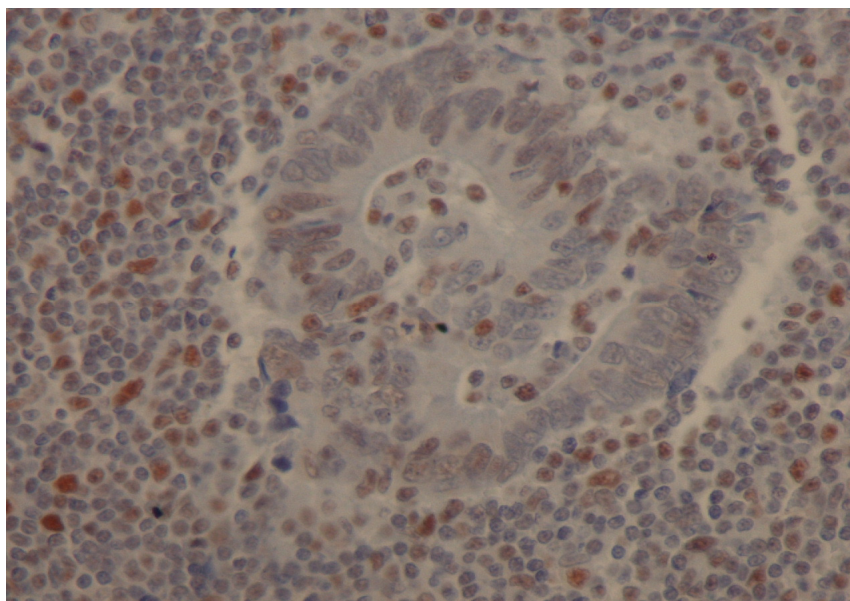


Εικόνα 21B



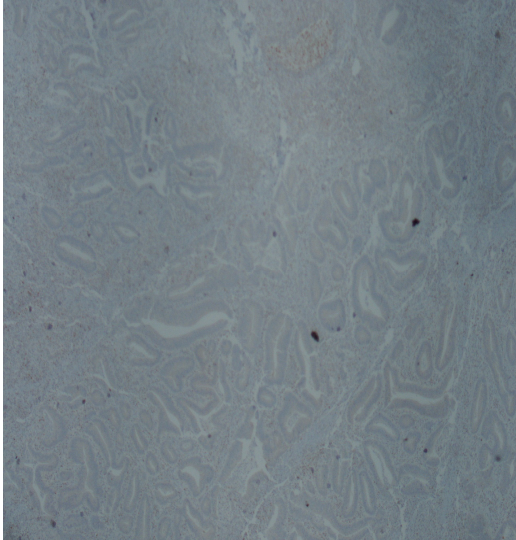
Εικόνα 22: Ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx400)

Εικόνα 22

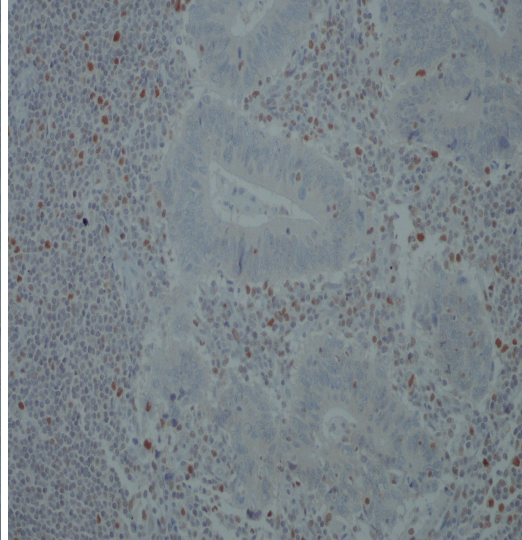


Εικόνα 23: **A)** Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx100) **B)** Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx200)

Εικόνα 23A

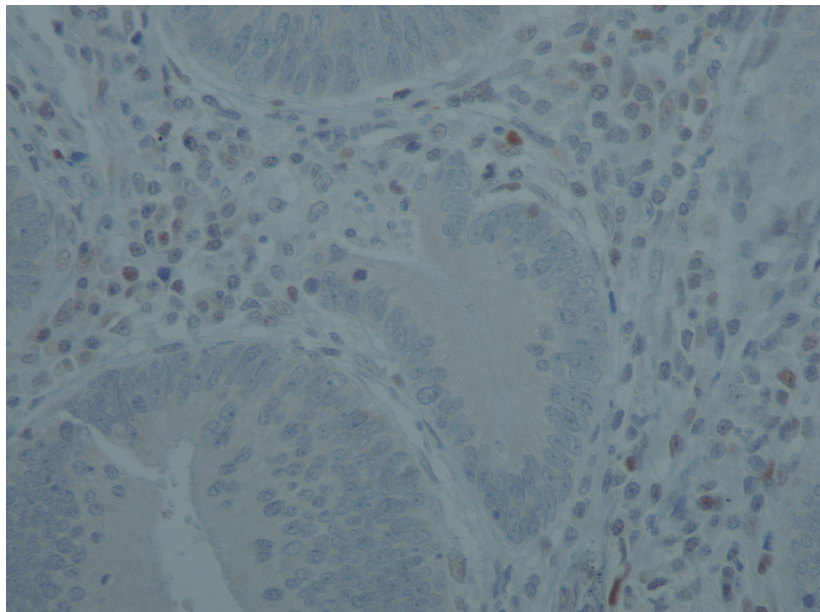


Εικόνα 23B



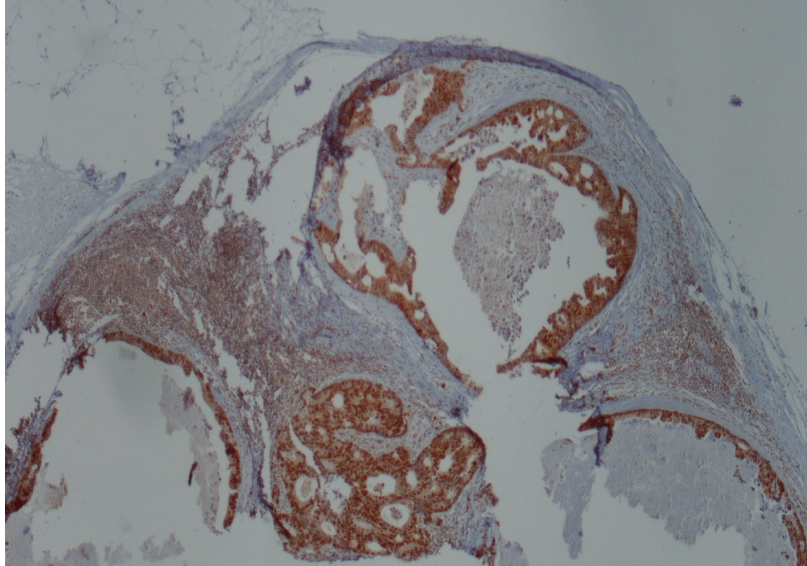
Εικόνα 24: **A)** Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2 σε αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου (DABx400)

Εικόνα 24



Εικόνα 25: Διατήρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα σε λεμφαδένα (DABx40)

Εικόνα 25



2.5 Συνδυαστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανά δείκτη:

1. MLH1: στην εξεταζόμενη πρωτεΐνη MLH1 δεν υπήρχε καμία απώλεια/μείωση της, στα παρασκευάσματα από τους υπερπλαστικούς πολύποδες που προέκυψαν από ενδοσκοπικές βιοψίες. Επίσης δεν υπήρχε καμία απώλεια/μείωση της, ούτε στα παρασκευάσματα από τους αδενωματώδεις πολύποδες. Και το ίδιο ισχύει και για το αδενοκαρκίνωμα που αναπτύχθηκε επί εδάφους αδενωματώδους σωληνολαχνωτού πολύποδα. Σε καμία από αυτές τις τρεις προαναφερθείσες παθήσεις (καλοήθειες και κακοήθειες) του παχέος εντέρου δεν παρατηρήθηκε απώλεια/μείωση της έκφρασης της MLH1 πρωτεΐνης και η ένταση της πυρηνικής χρώσης παρατηρήθηκε σε ποσοστό της τάξεως του 100%. Σε όλες τις περιπτώσεις των αδενοκαρκινωμάτων υπήρχε έκφραση του MLH1 εκτός από μια. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 σε ποσοστό <50% των νεοπλασματικών κυττάρων. Η ελάττωση της πρωτεΐνης ανέρχεται σε ποσοστό 2% (αφού στα πενήντα περιστατικά μας συνολικά, ελάττωση εξέφρασε μόνο το ένα). Η ελάττωση/μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 δεν συσχετίστηκε με κανέναν γενικό παράγοντα, όπως η ηλικία των ασθενών, το φύλο των ασθενών, το μέγεθος του όγκου, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, ή ακόμα και το στάδιο της νόσου. Συγκεκριμένα σε περιστατικά με αναγνωρισμένες μεταστάσεις η έκφραση της πρωτεΐνης MLH1 διατηρήθηκε (βλ. Εικόνα 25). Επίσης δεν υπήρχαν διαφορετικού είδους συνθήκες στα εξεταζόμενα περιστατικά ώστε να δικαιολογείται η απώλεια από κάποιον εξωτερικό παράγοντα ή ακόμα και να θεωρηθεί τυχαίο ή ποσοτικό σφάλμα. Επίσης στο δείγμα που υπήρχε απώλεια MMR δεν παρατηρήθηκε τίποτα διαφορετικό όσον αφορά τη διαμόρφωση των κυττάρων μικροσκοπικά (διαφορετικό κυτταρικό μέγεθος σε σχέση με τα υπόλοιπα εξετασθέντα πλακάκια, κάποιου είδους αλλοίωση που δεν έχει παρατηρηθεί κ.ά.).

2. MSH2: τα αποτελέσματα της έκφρασης της εξεταζόμενης πρωτεΐνης MSH2 εμφάνισαν τα ίδια ποσοστά ακριβώς με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη MLH1. Δεν υπήρχε καμία απώλεια/μείωση της έκφρασής της ούτε στους υπερπλαστικούς πολύποδες, ούτε στους αδενωματώδεις πολύποδες, ούτε και στο αναπτυχθέν αδενοκαρκίνωμα επί εδάφους πολύποδα. Η πυρηνική χρώση είναι έντονη σε ποσοστό 100%. Απώλεια/μείωση της MSH2 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε ένα περιστατικό αδενοκαρκινώματος στο οποίο είχε παρατηρηθεί αντίστοιχα και απώλεια της MLH1

πρωτεΐνης. Η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH2 παρατηρήθηκε σε ποσοστό <50% των νεοπλασματικών κυττάρων (2% επί του συνολικού αριθμού των αδενοκαρκινωμάτων που μελετήθηκαν). Στα περιστατικά δεν εμφανίστηκαν διαφορές μεταξύ των ηλικιακών ομάδων, το φύλο, το στάδιο της νόσου και το μέγεθος του όγκου. Επίσης δεν εμφανίστηκαν και κυτταρικές διαφορές σε μικροσκοπικό επίπεδο.

3. MSH6: η χρώση με την MSH6 πρωτεΐνη μας έδειξε διαφοροποιημένα αποτελέσματα για όλες τις κατηγορίες. Αναλυτικά, υπήρχε ελαφρά μείωση της έκφρασής της σε δύο από τους εννέα υπερπλαστικούς πολύποδες. Η μείωσή της δεν ήταν μεγάλη αφού μικροσκοπικά παρατηρήσαμε πως η χρώση ήταν έντονη πυρηνική σε ποσοστό 80% των επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασής της και σε δυο αδενωματώδεις πολύποδες από τους 21 συνολικά. Στα δυο αυτά σκευάσματα η ανοσοχρώση ήταν έντονη και εκφραζόταν σε ποσοστό 50% - 80% των νεοπλασματικών κυττάρων. Συγκριτικά με το MLH1 και MSH2 η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης hMSH6 όσον αφορά την κατηγορία των αδενοκαρκινωμάτων ανέρχεται σε δυο από τα πενήντα εξετασθέντα περιστατικά με το ποσοστό απώλειας να ανέρχεται στο 4%. Το ένα αδενοκαρκίνωμα εμφάνισε πλήρη απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης και στην άλλη περίπτωση ήταν το αδενοκαρκίνωμα στο οποίο αναγνωρίστηκαν περιφερικά στοιχεία αδενωματώδους πολύποδα και στην εξέταση με την MSH6 πρωτεΐνη, ο πολύποδας εμφάνισε ασθενή ανοσοχρώση σε < 50% των νεοπλασματικών κυττάρων και το διηθητικό καρκίνωμα εμφάνισε πλήρη απουσία χρώσης άρα και απώλεια της πρωτεΐνης MSH6. Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πιθανολογείται ότι η απώλεια των MMRP, αποτελεί πρώιμο στάδιο της κακοήθους εξαλλαγής, καθώς αναγνωρίστηκε και σε αδενωματώδη πολύποδα επί εδάφους του οποίου αναπτύχθηκε έπειτα το αδενοκαρκίνωμα. Με τα αποτελέσματά μας βλέπουμε πως ποικίλλει η απώλεια των MMR αναλόγως πάντα και με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη. Δεν υπάρχει κι εδώ κάποια συσχέτιση με γενικό παράγοντα, όπως η ηλικία των ασθενών, το φύλο των ασθενών, το μέγεθος του όγκου, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, ή ακόμα και το στάδιο της νόσου. Όπως επίσης δεν αναγνωρίζεται και κάποια διαφορά μικροσκοπικά.

4. PMS2: στους υπερπλαστικούς και στους αδενωματώδεις πολύποδες συνολικά δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως μείωση της έκφρασης της προς εξέταση πρωτεΐνης PMS2. Η ανοσοχρώση ήταν έντονη πυρηνική σε ποσοστό 100%. Η απώλεια της

πρωτεΐνης PMS2 παρατηρήθηκε σε δυο περιστατικά αδενοκαρκινώματος από τα πενήντα συνολικά. Στα ίδια δυο περιστατικά αδενοκαρκινωμάτων που εμφανίστηκε και η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6. Το ποσοστό απώλειας/μείωσης της έκφρασης της PMS2 πρωτεΐνης είναι στο 4%. Το ένα αδενοκαρκίνωμα εμφάνισε πλήρη απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης. Η άλλη περίπτωση αφορούσε σε αδενοκαρκίνωμα στο οποίο αναγνωρίστηκαν περιφερικά στοιχεία αδενωματώδους πολύποδα και στην εξέταση με την PMS2 πρωτεΐνη, ο πολύποδας εμφάνισε ασθενή ανοσοχρώση σε ποσοστό <50% των νεοπλασματικών κυττάρων και το διηθητικό αδενοκαρκίνωμα εμφάνισε πλήρη απουσία χρώσης άρα και απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης PMS2. Στα όρια εκτομής του αδενωματώδους πολύποδα παρατηρήθηκε σχετικά έντονη απώλεια χρώσης. Υπάρχει υπόνοια πως η απώλεια της έκφρασης των MMR δύναται να ξεκινήσει από προκαρκινικές αλλοιώσεις και στη συνέχεια να εξελιχθεί η βλάβη και να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Τα ίδια αποτελέσματα από δυο διαφορετικά αντισώματα πάνω στα ίδια περιστατικά μας βοηθούν ώστε να είμαστε πιο σίγουροι, όσο είναι εφικτό για τα συμπεράσματά μας.

Συμπερασματικά παρατηρήθηκε πως η απώλεια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA δεν υφίσταται για τους υπερπλαστικούς πολύποδες. Όσον αφορά τους αδενωματώδεις πολύποδες υπάρχει μια πολύ μικρή μείωση του ποσοστού της έκφρασης αλλά η πρωτεΐνη εξακολουθεί να εκφράζεται και η απώλειά της αποτελεί εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο. Τέλος αναφορικά με τα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου εντοπίζονται διαταραχές στο σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, όπως αναδεικνύονται με την ελάττωση έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA -MMR- σε ποσοστό 4%. Δεν μπορούμε να γνωρίζουμε σε ποιο σημείο της καρκινογένεσης ακριβώς εμφανίζεται η απώλεια της έκφρασης των MMR, ωστόσο υπάρχει υπόνοια ότι ίσως συμβαίνει σε πρώιμο στάδιο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Μικροδορυφορική αστάθεια

Όπως έχουμε αναφέρει υπάρχουν περιοχές στο γονιδίωμα στις οποίες η δομή αλλάζει και προκαλείται η μικροδορυφορική αστάθεια. Αυτές οι περιοχές, επονομαζόμενες και μικροδορυφορικές, περιέχουν αλληλουχίες DNA με μικρή μονάδα επανάληψης (από 1 έως 4 βάσεις με συνηθέστερη την επανάληψη του δινουκλεοτιδίου CA, η οποία συμβαίνει δεκάδες χιλιάδες φορές σε ολόκληρο το γονιδίωμα). Μελέτες πάνω στα γονίδια διατήρησης και επιδιόρθωσης του DNA (MMR) που κι εμείς χρησιμοποιήσαμε (hPMS2, hMSH6, hMSH2, hMLH1) δείχνουν ξεκάθαρα πως μεταλλάξεις σε αυτά εμπλέκονται στην συντριπτική πλειοψηφία παθογένειας του κληρονομικού μη-πολυποδιασικού ορθοκολικού καρκίνου (HNPCC). Η μικροδορυφορική αστάθεια χαρακτηρίζει το σύνδρομο HNPCC στο ποσοστό της τάξης του 90% και σε ποσοστό 15% στον ΚΠΕ. Στις περιπτώσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου συνήθως η μικροδορυφορική αστάθεια σχετίζεται με την υπερμεθυλίωση του ενισχυτή των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, γεγονός που οδηγεί στην απενεργοποίησή τους ή στη δυσλειτουργία τους. Τόσο η διάγνωση της MSI-H, όσο και η αναζήτηση μεταλλάξεων γίνεται από τη μελέτη δειγμάτων του νεοπλασματος. [240-242] Γνωρίζουμε πως η μικροδορυφορική αστάθεια προκύπτει κατά την αντιγραφή αλλά δεν μπορούμε να γνωρίζουμε ακριβώς το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο λαμβάνει χώρα. Για αυτό το λόγο και η μικροδορυφορική αστάθεια δεν είναι εύκολο να αποτελέσει διαγνωστικό δείκτη στα πρώιμα στάδια ΚΠΕ. Γενικά αρκετές μελέτες έχουν ερευνήσει τη σχέση μεταξύ μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) και της γενικότερης επιβίωσης ασθενών με ΚΠΕ. Τα συμπεράσματα είναι διφορούμενα λόγω του γεγονότος ότι συνυπάρχουν και πολλοί άλλοι καθοριστικοί παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα. Ένας από τους συχνότερους και συνηθέστερους παράγοντες είναι ότι σε κάθε μία μελέτη, οι ομάδες των ασθενών συντίθενται από περιστατικά τα οποία διαφέρουν όσον αφορά την κατηγοριοποίηση των σταδίων του όγκου. Επίσης η διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών με MSI όγκους και MSS όγκους στη χημειοθεραπεία δυσκολεύει κατά πάρα πολύ την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το σίγουρο είναι όμως πως υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης της μικροδορυφορικής αστάθειας στον ΚΠΕ με την απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης μιας και δείχνει να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα καλύτερης πρόγνωσης και μειωμένης πιθανότητας

εμφάνιση λεμφαδενικών μεταστάσεων.[243-245] Στους καρκίνους, όπου η γενετική αστάθεια βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, υπάρχει η πιθανότητα συνύπαρξης χρωμοσωμικής και μικροδορυφορικής αστάθειας, παρά το γεγονός ότι συνήθως η μία αποκλείει την άλλη.

Με βάση το ποσοστό της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) που μπορεί να παρουσιάζει ένας όγκος μπορεί και να κατηγοριοποιηθεί και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Οι όγκοι του παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) παρουσιάζουν μια σειρά χαρακτηριστικών που τους διαφοροποιεί με ακρίβεια από τους υπολοίπους όγκους του παχέος εντέρου. Παρακάτω παραθέτουμε συνοπτικά τα χαρακτηριστικά αυτά:

- Το 80% των σποραδικών MSI όγκων (15%-30% του συνολικού ποσοστού του ΚΠΕ) βρίσκονται στο εγγύς κόλον.
- Οι μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται σε γονίδια με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρατηρούνται μόνο σε MSI καρκίνους.
- Η απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity – LOH) δεν αποτελεί συχνό φαινόμενο στους MSI καρκίνους.
- Οι MSI όγκοι σπανίως εμφανίζουν μεταλλάξεις στα κλασσικά μεταλλάσσόμενα γονίδια όπως το APC, K-ras και p53 σε αντίθεση με τους όγκους χωρίς MSI.

Οι διαφορές που επιτρέπουν την ταξινόμηση των όγκων του παχέος εντέρου καθιστούν ευκολότερη και τη διαφοροποίηση μεταξύ τους σε επίπεδο συμπεριφοράς και αντίδρασης σε προφυλακτική και θεραπευτική αγωγή. [246-252] Αυτές οι σημαντικές διαφορές που χαρακτηρίζουν τους MSI όγκους σε σχέση με τους υπολοίπους είναι:

- ❖ Οι MSI όγκοι, σποραδικοί ή κληρονομούμενοι, είναι λιγότερο επιθετικοί από τους υπολοίπους.
- ❖ Οι ασθενείς με MSI όγκους συνήθως θα εμφανίζουν πολλαπλούς σύγχρονους είτε μετάχρονους καρκίνους του παχέος εντέρου.
- ❖ Οι MSI όγκοι είναι λιγότερο ευαίσθητοι σε κυτταροστατικά φάρμακα και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και ανταπόκριση στην ενισχυτική χημειοθεραπεία. Οι ασθενείς είναι λιγότερο ευαίσθητοι στη 5-FU.
- ❖ Οι ασθενείς δεν παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά επιβίωσης στην ακτινοθεραπεία.
- ❖ Οι MSI όγκοι παρουσιάζουν ελάχιστη ή καθόλου έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2). Είναι ήδη γνωστό ότι αναστολείς της COX-2 όπως η ασπιρίνη λειτουργεί προστατευτικά παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη αδενωμάτων και όγκων. Επομένως, η μειωμένη έκφραση της COX-2 στους MSI όγκους ίσως και να σημαίνει μειωμένη αντίδραση στη συγκεκριμένη χημειοπροφύλαξη.
- ❖ Επίσης οι MSI όγκοι δε δίνουν συνήθως απομακρυσμένες μεταστάσεις ή μεταστάσεις σε λεμφαδένες (λόγω της επαγωγής αγγεογένεσης της COX-2, είναι δυνατό η μειωμένη έκφρασή της στους MSI-H καρκίνους να εξηγεί, εν μέρει, το μειωμένο μεταστατικό τους δυναμικό.)
- ❖ Η ανίχνευση θετικών για MSI όγκων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανάλυσης οικογένειας για την ανέρευνα παθογόνου μετάλλαξης στα γονίδια του HNPCC.
- ❖ Οι MSI όγκοι εμφανίζουν σε πολύ μικρότερο ποσοστό μεταλλάξεις στα γονίδια K-Ras και p53.

2. Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των MMR πρωτεϊνών και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) αποτελεί ένα από τα πιο χρήσιμα διαγνωστικά εργαλεία τα τελευταία χρόνια, αν και στην αρχή είχε αμφισβητηθεί η χρησιμότητά της. Η ανοσοϊστοχημεία είναι απλή και διαθέσιμη τεχνική. Εμφανίζονται αρκετές μελέτες που εξετάζουν το εάν η ανοσοϊστοχημεία (ICH) ή ο έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) έχει τη μεγαλύτερη ακρίβεια στην γρηγορότερη και σωστότερη πρόβλεψη ύπαρξης μεταλλάξεων στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MMR). Η πληθώρα των μελετών είναι αναδρομικές και έτσι υπάρχει μεγάλη ποικιλία στις μεθόδους και τους τρόπους εφαρμογής τους, με μια από αυτές να είναι και η ανοσοϊστοχημεία. Ο αριθμός των δεικτών μικροδορυφορικής αστάθειας που χρησιμοποιείται δεν είναι συγκεκριμένος αλλά ποικίλλει από 1 έως και άνω των 10. Για την ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιούνται κυρίως δύο αντισώματα (MLH1 και MSH2), υπάρχουν όμως και μελέτες που χρησιμοποιούν 3 ή και 4 αντισώματα (MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2), τα αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε και στην παρούσα εργασία. Υπάρχουν μελέτες όπου εφαρμόστηκαν ταυτόχρονα και η μικροδορυφορική αστάθεια αλλά και η ανοσοϊστοχημεία ως δείκτης ευαισθησίας, με την πρώτη να παίρνει ένα ελαφρύ προβάδισμα. [253-257] Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας όμως τελικά φαίνεται να πλεονεκτεί διότι έχει μεγαλύτερη δυνατότητα ακριβούς υπόδειξης της γονιδιακής βλάβης σχετικά με την παρατηρούμενη χρώση. Παρακάτω παραθέτουμε κάποια στοιχεία από τις ήδη υπάρχουσες μελέτες που ασχολήθηκαν με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) στο παχύ έντερο σε σύγκριση πάντα και με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης.

Στη δική μας εργασία μελετήσαμε τέσσερα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA σε τριών ειδών κατηγορίες παθήσεων του παχέος εντέρου. Υπερπλαστικοί πολύποδες, αδενωματώδεις πολύποδες, αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου και την υποκατηγορία που περιλαμβάνει το αδενοκαρκίνωμα αναπτυχθέν επί εδάφους αδενωματώδη πολύποδα. Θα προσπαθήσουμε να φέρουμε στην επιφάνεια την πλειοψηφία πλησιέστερων μελετών για τη σύγκριση και εξαγωγή αποτελεσμάτων.

ΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας στους υπερπλαστικούς πολύποδες δεν παρατηρείται απώλεια της έκφρασης των τεσσάρων (MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2) πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA. Άρα το σύστημα διατήρησης και επιδιόρθωσης του DNA (MMR system) δε φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη υπερπλαστικών πολυπόδων του παχέος εντέρου. Στις καλοήθειες παθήσεις σύμφωνα και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία γνωρίζουμε πως δεν υπάρχει απώλεια της έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA. Αυτή η εξαλλαγή φαίνεται να γίνεται κατά την αρχή της καρκινογένεσης σε κάποιο σημείο. Τα αποτελέσματά στην μελέτη μας έρχονται να το επιβεβαιώσουν διότι δεν παρατηρήθηκε απώλεια σε καμία από τις 4 περιπτώσεις πρωτεϊνών που εξετάστηκαν.

ΑΔΕΝΩΜΑΤΩΔΕΙΣ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ

Με βάση τα αποτελέσματά μας παρατηρούμε πως δεν υπάρχει απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 ούτε και στα περιστατικά από τους αδενωματώδεις πολύποδες, αλλά αποτελεί εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τις έως τώρα δημοσιευμένες εργασίες οι οποίες υποστηρίζουν πως η απώλεια των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA λαμβάνει χώρα κάποια στιγμή στην αρχή της διαδικασίας της εξαλλαγής των κυττάρων από φυσιολογικά σε κακοήθη.

ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) είναι πλήρως εφικτή σε αρχειακό υλικό. Η απώλεια των MMR στα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου ποικίλλει και εξαρτάται πάντα από την εξεταζόμενη πρωτεΐνη. Στα αδενοκαρκινώματα του πληθυσμού της Ηπείρου που μελετήσαμε η εκτιμώμενη απώλεια/μείωση τουλάχιστον δυο πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA είναι στο 4%.

3. Ρόλος των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA στην παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου

Λόγω λοιπόν της ευρείας διάδοσης, ευκολίας αλλά και ακρίβειας η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιείται από τους περισσότερους ερευνητές ως βασική μέθοδος για τον πρωταρχικό έλεγχο οικογενειών με πιθανή μετάλλαξη στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. [260,261]

Αυτή τη θεωρία έρχονται να στηρίξουν κάποιες μελέτες όπως μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Πανεπιστήμιο της Γερμανίας με 1.119 περιστατικά ασθενών οι οποίοι είτε κάλυπταν τα κριτήρια Amsterdam είτε τα κριτήρια Bethesda. Εντοπίστηκαν συνολικά 230 μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης. Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της μικροδορυφορικής αστάθειας και της ανοσοϊστοχημείας με την τελευταία να γίνεται με χρήση δυο αντισωμάτων. Η ευαισθησία της μεθόδου έφτασε στο 97%. [258] Αφού λοιπόν με τη χρήση των δυο αντισωμάτων είχε εξαιρετικά αποτελέσματα, συμπεραίνουμε πως με την πρόσθεση κι άλλων αντισωμάτων η ευαισθησία της μεθόδου θα άγγιζε το 100%.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Νοσοκομείο στη Ρουμανία, μελετήθηκαν 29 δείγματα ασθενών από χειρουργικά παρασκευάσματα και αποτελέσματα ενδοσκοπικής βιοψίας πολυπόδων και ιστολογικά δείγματα όγκος-φυσιολογικό επιθήλιο. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας με τη βοήθεια 9 αντισωμάτων για να εντοπιστεί το «μοντέλο» έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων MMR στα παρασκευάσματα. Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε δεχθεί χημειοθεραπεία και η ηλικία τους κυμαινόταν από 41 έως 80 ετών. Από τα 29 περιστατικά τα τρία αφορούσαν πολύποδες και τα 27 διαγνώστηκαν με αδενοκαρκίνωμα. Τα 9 αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ANKRD17, EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 και MSH6. Σε όλα τα καρκινικά δείγματα παρατηρήθηκε μειωμένο επίπεδο έκφρασης των MMR εκτός από το γονίδιο EXO1. Ο αριθμός των ασθενών που έδειξαν μεγαλύτερη έκφραση των MMR στο κανονικό επιθήλιο ήταν πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των ασθενών που έδειξαν υψηλή έκφραση στο εσωτερικό του όγκου. Συγκεκριμένα το ANKRD17 φαίνεται να έχει ιδιαίτερη προγνωστική αξία λόγω του ότι σε 16 υποθέσεις είχε πολύ υψηλότερη έκφραση στο φυσιολογικό επιθήλιο απ' ότι στους όγκους, εν αντιθέσει με 6 περιπτώσεις που η έκφραση του ήταν υψηλότερη στους όγκους. Στους πολύποδες

που μελετήθηκαν υπήρχε υψηλή έκφραση των 8 από τα 9 γονίδια επιδιόρθωσης που χρησιμοποιήθηκαν. Άρα αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση πως η υψηλή έκφραση των MMR μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη για την εμφάνιση και τον πολλαπλασιασμό νεοπλασματος. Και η σύγκριση στον τρόπο αντίδρασης μεταξύ πολυπόδων-φυσιολογικού επιθηλίου-αδενοκαρκινώματος αποτελεί δείκτη αναγνώρισης στο πως μπορεί να ξεκινά η καρκινογένεση λόγω ανεπάρκειας των γονιδίων επιδιόρθωσης (MMR). [262]

Μια ομάδα μελετητών από το Πανεπιστήμιο του Southampton ερεύνησε την έκφραση των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA σε 112 περιπτώσεις ΚΠΕ συνολικά. Το υλικό τους προήλθε από χειρουργικά δείγματα αλλά και από δείγματα από ενδοσκοπικές βιοψίες. Στις ενδοσκοπικές βιοψίες τα αποτελέσματα μπορούσαν να ερμηνευθούν πληρέστερα. Στα χειρουργικά παρασκευάσματα υπήρχαν 10 περιπτώσεις που δεν ήταν εύκολη η εξαγωγή αποτελεσμάτων λόγω της αποσπασματικής χρώσης του υλικού (ενδεχομένως από λανθασμένη κοπή). Γενικά υπήρξε πλήρης συμφωνία των αποτελεσμάτων και από τα δυο ειδών παρασκευάσματα, με λίγο πιο έντονη τη χρώση στα δείγματα από τις βιοψίες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα δείγματα είναι μικρότερα σε μέγεθος άρα και ευκολότερα διαχειρίσιμα και δείχνουν να έχουν πιο συμπαγή χρώση. Συνολικά υπήρξε απώλεια των γονιδίων διατήρησης και επιδιόρθωσης σε ποσοστό 13%. Αναλυτικότερα, υπήρξε απώλεια 11% MLH1, 12% PMS2, 1% MSH2 και 1% MSH6. Βλέπουμε και εδώ όπως και στη δική μας μελέτη πως ανάλογα με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη ποικίλλει η απώλεια των MMR. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν σε δυο από τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες (MLH1, MSH2). Για την ακρίβεια οι διαφορές στη συγκεκριμένη μελέτη μεταξύ των πρωτεϊνών ποσοστικά είναι αρκετά μεγάλες που μας υποδεικνύει την ευαισθησία και την ακρίβεια του εργαλείου της ανοσοϊστοχημείας στην διάγνωση. Οι συγκεκριμένοι μελετητές έπειτα από την έρευνα αυτή συνηγορούν υπέρ της ανοσοϊστοχημικής χρώσης που πρέπει να γίνεται σε δείγματα από ενδοσκοπικές βιοψίες προτού υπάρξει καρκινογένεση ώστε να μπορούν να βλέπουν την έκφραση των MMRP προτού οι όγκοι αλλάξουν από ενδεχόμενη χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Έτσι θα μπορούσαν να αναγνωριστούν οι φορείς των μεταλλάξεων των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA και θα είχαμε καλύτερη αντιμετώπιση του ασθενούς προτού υπάρξει εξέλιξη σε κακοήθεια και πλήρης απώλεια των MMRP. [263]

Σε άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Ohio State University, το οποίο είναι και από τα πρώτα Πανεπιστήμια που αποτελεί ιατρικό κέντρο για ανοσοϊστοχημικές εξετάσεις των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, μελετήθηκε η ανοσοχρώση των MMR σε νεοδιαγνωσθέντα περιστατικά ΚΠΕ. Συνολικά μελετήθηκαν 270 περιστατικά εκ των οποίων στα 57 (21,1%) υπήρχε απώλεια έστω και μιας από τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα υπήρχε απώλεια MSH6 σε ποσοστό 17,5%, συνδυαστικά απώλεια σε MSH6 και MSH2 σε ποσοστό 12,3%. Απώλεια PMS2 σε ποσοστό 1,8% και στο ίδιο ποσοστό υπήρχε και συνδυαστική απώλεια των MLH1, PMS2 και MSH6. Και σε αυτή τη μελέτη βλέπουμε πως ανάλογα με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη ποικίλλει η απώλεια των MMR. Πολλοί από τους ασθενείς κλήθηκαν πίσω στην κλινική για συμπληρωματικές εξετάσεις (follow up). Αυτό δεν αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό μιας και επέστρεψε ένα μικρότερο ποσοστό από το αναμενόμενο. Αυτό λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας για τη διάγνωση των ασθενών. Παρόλα ταύτα τα αποτελέσματα της εν λόγω έρευνας συγκλίνουν με τα δικά μας στο γεγονός πως επιβεβαιώνεται η ευκολία και η χρήση της μεθόδου της ανοσοχρώσης σε αρχαιακό υλικό και πως η απώλεια των MMR ποικίλλει ανάλογα με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη. [264]

Σε άλλη πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκαν 62 περιπτώσεις πολυπόδων. Οι κατηγορίες ήταν οι εξής: 37 αδενώματα, 23 υπερπλαστικοί πολύποδες και 2 άμισχοι οδοντωτοί πολύποδες. Οι ανωτέρω περιπτώσεις εξετάστηκαν για εμφάνιση μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) και την απώλεια των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA (MMR). Επίσης αυτές οι περιπτώσεις ήταν ασθενείς με επιβεβαιωμένο HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer). Συνολικά, ένα ποσοστό 50% από τα αδενώματα είχαν απώλεια χρώσης. Και μάλιστα τα αποτελέσματα εξαρτιόταν άμεσα από το μέγεθος των πολυπόδων. Για την ακρίβεια σύμφωνα με το μοντέλο που φτιάξανε οποιοσδήποτε πολύποδας μεγαλύτερος από 8mm, έχει πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα να δείξει απώλεια των MMR κατά την εξέταση με ανοσοχρώση, συγκριτικά με τους μικρότερους πολύποδες (<8mm). Αυτό δεν έρχεται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, στα οποία το εκάστοτε μέγεθος των πολυπόδων, δεν έπαιξε κάποιο ρόλο στο αποτέλεσμα της χρώσης και τα στατιστικά μας. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των υπερπλαστικών πολυπόδων, στην εν λόγω εργασία έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας. Δεν υπάρχει καθόλου απώλεια των γονιδίων επιδιόρθωσης. Βέβαια από μόνη της η έρευνα είναι αρκετά

περιορισμένη λόγω της επιλογής των ασθενών με επιβεβαιωμένο HNPCC. Οπότε και τα αποτελέσματα για ανεπάρκεια ή μη MMR δεν μπορούν να θεωρηθούν ακλόνητα. Άλλωστε οι μέχρι στιγμής μελέτες σε πολύποδες παχέος εντέρου και συγκεκριμένα αδενωματώδεις τοποθετούν την απώλεια των MMR σε ποσοστό που αγγίζει το 2%. [265]

Σε μελέτη του 2011 στην Τεχεράνη μελετήθηκαν 400 περιστατικά ασθενών με πολύποδες του παχέος εντέρου οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε πολυποδεκτομή. Υπήρχε απώλεια MLH1 σε ποσοστό 6,8%, 4,5% για MSH2, 3% για MSH6 και 4,8% απώλεια PMS2. Σε όλες τις περιπτώσεις απώλειας ή δυσλειτουργίας του PMS2, περιλαμβανόταν και απώλεια του MLH1. Ίδια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και για την απώλεια του MSH2, στο ποσοστό του οποίου περιλαμβανόταν και συνοδευόμενη απώλεια του MSH6. Και σε αυτή την μελέτη δεν αναφέρεται κάποια συσχέτιση της απώλειας MMR και της ανάπτυξης δυσπλασίας με το φύλο των ασθενών, τον τύπο του αδενώματος, την επιθετικότητα του όγκου ή το βαθμό δυσπλασίας. Η διαφορά ανευρίσκεται μόνο στην ηλικία των ασθενών και την τοποθεσία ανάπτυξης του πολύποδα, με την έρευνα αυτή να υποστηρίζει βάση των αποτελεσμάτων της πως στο αριστερό κόλον υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης δυσπλασίας με πιθανή δυσλειτουργία του MMR. [266]

Έρευνα Νοσοκομείου στα Ενωμένα Αραβικά Εμιράτα χρησιμοποίησε 38 ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου. Συνολικά μελετήθηκαν 114 ιστολογικές τομές από τα χειρουργικά παρασκευάσματα που προέκυψαν από τους 38 αυτούς ασθενείς με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και εξετάστηκαν για την έκφραση/απώλεια των MMR πρωτεϊνών MLH1 και MSH2 αντίστοιχα. Από τους 38 ασθενείς οι 21(55.3%) ήταν άρρενες και οι 17 (44.7%) θήλεις. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 61.4 έτη. Στα αποτελέσματα θεωρήθηκε θετική η χρώση όταν υπήρχε ποσοστό >10% των κυττάρων που να έχουν βαφεί. Η έκφραση των δυο εξεταζομένων πρωτεϊνών MLH1 και MSH2 κρίθηκε ανεπαρκής σε 9 από τους 38 ασθενείς (23.7%), εκ των οποίων οι 6 παρουσίασαν ανεπάρκεια στην MLH1 πρωτεΐνη (23%), οι δυο ασθενείς στην MSH2 πρωτεΐνη (5.26%) και ένας ασθενής παρουσίασε απώλεια/ανεπάρκεια και στις δυο πρωτεΐνες MLH1 και MSH2 (2.63%) αντίστοιχα. Οι έξι ασθενείς που παρουσίασαν απώλεια της MLH1 πρωτεΐνης, ο όγκος συνοδευόταν και από μικροδορυφορική αστάθεια, ενώ τέσσερις από τους υπόλοιπους 25 ασθενείς που εξέφραζαν την MLH1 πρωτεΐνη έδειξαν μικροδορυφορική αστάθεια. Καμία

παρατήρηση μικροδορυφορικής αστάθειας των όγκων δεν έγινε για τα περιστατικά που εξέφρασαν, είτε όχι την MSH2 πρωτεΐνη. Καταλήγοντας ο φυσιολογικός φαινότυπος MMR επηρεάζεται από την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας και επί του συγκεκριμένου υπάρχει απουσία λειτουργικής MMR πρωτεΐνης, της MLH1. Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου για τις δυο αυτές πρωτεΐνες έρχονται σε ποσοστιαία συμφωνία με την παρούσα έρευνα και με τα γενικότερα παγκόσμια ποσοστά με μια απόκλιση στην έκφραση της MLH1.[267]

Σε αντίστοιχη έρευνα στη Μαλαισία συμμετείχαν 148 ασθενείς και χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένα δείγματα από τα χειρουργικά παρασκευάσματα τριών διαφορετικών Νοσοκομείων της Μαλαισίας. Οι ασθενείς ήταν 77 άρρενες και 71 θήλεις. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση στα δείγματα που περιείχαν ΚΠΕ για τις τέσσερις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και συγκεκριμένα τις MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2. Τρεις από αυτούς τους ασθενείς είχαν πολλαπλούς σύγχρονους καρκίνους. Σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό 28 από τους 148 ασθενείς (18.7%) είχαν απουσία/μείωση MMR. Συγκεκριμένα σε τρεις περιπτώσεις υπήρχε απουσία μόνο της MLH1 πρωτεΐνης, σε άλλες τρεις απουσία της MSH2 πρωτεΐνης και πάλι σε άλλες τρεις απουσία μόνο της PMS2 πρωτεΐνης. Σε δυο μόνο περιπτώσεις υπήρχε απουσία/μείωση της MSH6 πρωτεΐνης. Αναδείχθηκε και μια περίπτωση ασθενούς με ταυτόχρονη απουσία έκφρασης των MLH1, MSH6 και PMS2 πρωτεϊνών. Αυτός ο ασθενής ήταν ένας εκ των οποίων είχαν τους πολλαπλούς σύγχρονους καρκίνους. Εντύπωση προκαλεί με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής η ανωμαλία στην έκφραση των MMR πρωτεϊνών ανάλογα με την ιστολογική διαφοροποίηση των καρκινωμάτων. Το 50% των χαμηλά διαφοροποιημένων καρκινωμάτων δείχνουν πλήρη απουσία έκφρασης των MMR πρωτεϊνών, σε αντίθεση με το χαμηλό ποσοστό της τάξεως του 13.8% των μετρίως διαφοροποιημένων όγκων και το επίσης χαμηλό ποσοστό της τάξης του 15% των καλά διαφοροποιημένων όγκων. [268]

Αρκετά διαφορετικά φαίνονται να είναι τα αποτελέσματα έρευνας που πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία και μελετήθηκαν 7 γονίδια διατήρησης και επιδιόρθωσης του DNA, τα PMS2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, OGG1 και MTH1. Μελετήθηκαν 1.068 ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί χειρουργική αφαίρεση ΚΠΕ. Ασθενείς με ιστορικό που πληρούσαν τα κριτήρια Amsterdam ή Bethesda και ήταν ύποπτοι για HNPCC, απορρίφθηκαν από τη μελέτη. Όπως και ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου. Ο μέσος όρος διάγνωσης

ΚΠΕ στους 1.068 ασθενείς ήταν τα 59 έτη . Δεν βρέθηκε καμία απολύτως συσχέτιση μεταξύ των μελετηθέντων περιστατικών σποραδικού καρκίνου παχέος εντέρου με την έκφραση και των ανωτέρω 7 γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA. Η συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης δείχνει να μην έχει καμία απολύτως συνάφεια με τα συλλεχθέντα δείγματα από Γερμανικό πληθυσμό. Αναμένονται νέες μελέτες με μεγαλύτερη ηλικιακή και πληθυσμιακή κάλυψη για να αποδειχθεί εάν οι διάφορες αυτές μεταβλητές θα επιδείξουν κάποιο διαφορετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας βέβαια και τις ίδιες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA. [269]

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Τσεχία στην οποία σύμφωνα και με στατιστικά αποτελεί από τις χώρες με το υψηλότερο ποσοστό ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου. Μελετήθηκαν 53 περιστατικά ασθενών με σποραδικό ΚΠΕ οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε χειρουργείο. Χρησιμοποιήθηκε ένα πάνελ 11 αντισωμάτων (EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, και PMS2L3) μέσα σε αυτά και τα τέσσερα του ενδιαφέροντός μας. Κάποια από αυτά στο τέλος αφαιρέθηκαν από το τελικό συμπέρασμα λόγω της εξαιρετικά χαμηλής τους απόδοσης (MSH4, MSH5 και PMS2L3). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της έκφρασης των πρωτεϊνών αναλογικά με την τοποθεσία του όγκου. Από τα 53 περιστατικά οι 38 ήταν άρρενες και 15 θήλεις με μέσο όρο ηλικίας τα 67 έτη. Τα 26 περιστατικά ήταν εντοπισμένα στον κόλον και τα υπόλοιπα 27 στο ορθό. Σχεδόν όλες οι MMR πρωτεΐνες που μελετήθηκαν επέδειξαν αυξημένη έκφραση στα περιστατικά που αφορούσαν το κόλον εν αντιθέσει με τα περιστατικά που αφορούσαν το ορθό. Κάποια ιδιαίτερη διαφορά ανάμεσα σε δεξί και αριστερό κόλον δεν παρατηρήθηκε. Και στα 58 αυτά παρασκευάσματα μελετήθηκε αν υπάρχει μεθυλίωση του ενισχυτή των πρωτεϊνών. Στην μοναδική που βρέθηκε μεθυλίωση του ενισχυτή ήταν η MLH1 πρωτεΐνη ενώ δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις άλλες πρωτεΐνες διατήρησης και επιδιόρθωσης του DNA. Μάλιστα στους ασθενείς που παρατηρήθηκε μεθυλίωση του ενισχυτή της MLH1 πρωτεΐνης στους φυσιολογικούς ιστούς, συνοδευόταν πάντα και ο παρακείμενος όγκος με μεθυλίωση του ενισχυτή της MLH1 πρωτεΐνης. Παρόλα ταύτα δεν παρατηρήθηκε διαφορετικότητα της έκφρασης της MLH1 σε ασθενείς με ΚΠΕ είτε ήταν μεθυλιωμένος ο ενισχυτής της αντίστοιχης πρωτεΐνης είτε όχι. [270]

Σε έρευνα στο Sydney της Αυστραλίας μελετήθηκαν 344 περιπτώσεις ΚΠΕ. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 69,3 έτη και οι γυναίκες ασθενείς ήταν σε διπλάσιο αριθμό από

τους άνδρες (71,2%). Έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση με τέσσερα αντισώματα και 104 περιπτώσεις από τις 344 έδειξαν απώλεια σε τουλάχιστον ένα από τα τέσσερα αντισώματα (MMR deficiency). Τα υπόλοιπα 240 περιστατικά είχαν θετική χρώση και για τα τέσσερα εξεταζόμενα αντισώματα. Από τα 104 περιστατικά, στα 100 εμφανίστηκε αρμονική απώλεια πρωτεϊνών σε ζευγάρια, MLH1-PMS2 σε ποσοστό 85,6% και MSH2-MSH6 σε ποσοστό 10,6%. Σε δυο μόνο περιπτώσεις εμφανίστηκε ταυτόχρονη απώλεια τριών πρωτεϊνών (0,6% επί των συνολικών περιστατικών). Στατιστικά βλέπουμε πως η υπερμεθυλίωση του ενισχυτή του MLH1 παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στην συντριπτική πλειοψηφία της απώλειας του συστήματος MMR στον ΚΠΕ. Και με βάση τα αποτελέσματα όταν το PMS2 είναι αρνητικό συνήθως οφείλεται στην υπερμεθυλίωση του MLH1 ή σε κάποια μετάλλαξη που έχει πραγματοποιηθεί στο MLH1. Αυτό εξηγείται και λόγω της δημιουργίας των πρωτεϊνικών συμπλόκων από γονίδια επιδιόρθωσης μεταξύ τους (MLH1 με PMS2 και MSH2 με MSH6). Βασισμένοι στα αποτελέσματα της έρευνας αυτής προτείνουν η ανοσοϊστοχημική μέθοδος να πραγματοποιείται με τη χρήση ενός πάνελ δυο πρωτεϊνών και όχι τεσσάρων. Βέβαια η εν λόγω μέθοδος θα πρέπει να πραγματοποιείται σε άκρως εξειδικευμένα εργαστήρια με άκρως λεπτομερέστατη προσοχή. [271]

Σε άλλη μελέτη παρακολούθηθηκαν 125 ασθενείς από 97 οικογένειες με ή χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της κολονοσκόπησης του παχέος εντέρου [272]. Από τις 97 εξετασθείσες οικογένειες οι 29 κατηγοριοποιήθηκαν ως οικογένειες με Lynch syndrome και οι υπόλοιπες 68 όχι. Η συχνότητα ανεύρεσης αδενωμάτων και στις δύο ομάδες ασθενών ήταν ακριβώς η ίδια. Μεταγενέστερος καρκίνος εντοπίστηκε όμως μόνο στις οικογένειες με μικροδορυφορική αστάθεια (που συνοδεύονταν όμως και από Lynch syndrome) και όχι στις άλλες.

4. Συσχέτιση των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA με μεταστατικούς καρκίνους και με ανταπόκριση σε θεραπευτικά σχήματα

Ασθενείς με ΚΠΕ και μεταστάσεις

Εφόσον και αν ο καρκίνος διηθήσει και τον ορογόνο μυϊκό χιτώνα τότε τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διαχυθούν οπουδήποτε μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα λόγω βαρύτητας. Έτσι μπορεί να εμφυτευθούν στην ορθοκυστική ή την ορθομητρική πτυχή/περιοχή. Υπάρχει ενδεχόμενο ανάπτυξης ψηλαφητών μαζών κατά τη δακτυλική εξέταση οι οποίες αποτελούν κακά προγνωστικά σημεία και είναι γνωστές σαν ο «ύφαλος του Blumer» και σε πιο προχωρημένα στάδια ψηλαφώνται σαν «παγωμένη πύελος». Κατά τον ίδιο τρόπο μεταστάσεις μπορεί να εμφανιστούν και στις ωοθήκες σε ποσοστό 3-4% των αναπτυσσόμενων όγκων. Για το λόγο αυτό πολλοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομή θα πρέπει να συμπληρώνει μια εγχείρηση κολεκτομής για καρκίνο του παχέος εντέρου, ιδιαίτερα σε γυναίκες της μετακλιμακτηριακής περιόδου. Άλλοι συγγραφείς κρίνουν τα στοιχεία ανεπαρκή για να συμβουλεύσει κανείς ολική υστερεκτομή προκειμένου να ελαττωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου σε ασθενείς φορείς του MMR γονιδίου. Νωρίτερα έχουμε αναφέρει πως υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου σε φορείς μεταλλάξεως του γονιδίου MSH6. Και σε αυτή την περίπτωση προτείνεται από κάποιους συγγραφείς οι γυναίκες φορείς να υποβάλλονται σε υστερεκτομή μετά την εμμηνόπαυση για τη διαφύλαξη και προφύλαξή τους. Έρευνα από Νοσοκομείο στην Αμερική έρχεται να το τεκμηριώσει με τη χρήση μελέτης πάνω σε 315 γυναίκες φορείς μεταλλάξεως στα γονίδια επιδιόρθωσης και συγκεκριμένα του γονιδίου MSH6 εκ των οποίων οι 61 υποβλήθηκαν σε προληπτική χειρουργική επέμβαση σε μεσοδιάστημα δεκαετίας καμία εκ των ασθενών δεν παρουσίασε ανάπτυξη καρκίνου στο ενδομήτριο, ενώ στις υπόλοιπες που δεν είχαν υποβληθεί στο αντίστοιχο χειρουργείο το 33% ανέπτυξε καρκίνο στο ενδομήτριο. [273,274] Η υστερεκτομή μπορεί να απαιτείται και σε φορείς μεταλλάξεων των άλλων γονιδίων επιδιόρθωσης, καθώς και σε γυναίκες που πρέπει να χειρουργηθούν για καρκίνο του παχέος εντέρου, δεδομένου του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών και της δυσκολίας πρώιμης διάγνωσης τέτοιων όγκων.

Αναφορικά με τις μεταστάσεις στο ήπαρ, γνωρίζουμε πως ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου θα εμφανίσουν μεταστατική νόσο στο ήπαρ. Η πλειοψηφία των συγγραφέων αναφέρουν πως η χειρουργική αφαίρεση της μετάστασης έχει σαν αποτέλεσμα την επιμήκυνση της επιβίωσης αλλά και ενδεχομένως την πλήρη θεραπεία σε ορισμένες περιπτώσεις. [274-276] Αρνητικό βέβαια αποτελεί το γεγονός της καθυστερημένης ανίχνευσης των μεταστάσεων και ακολούθως τη δυσκολία της χειρουργικής αφαίρεσης, με κάποιους όγκους να κρίνονται μη εγχειρήσιμοι λόγω προχωρημένου σταδίου.

Ασθενείς με ΚΠΕ και ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία

Εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα με ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης του DNA δεν ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία με 5-φθοριουρακίλη και δεν υπάρχει κάποια ωφέλεια με τη χορήγηση της εν αντιθέσει με άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπου εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στην ιρινοτεκάνη. [277] Μελέτη 65 ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου σταδίου IV μας έδειξε τα παρακάτω. Οι 4 από τους 7 ασθενείς που είχαν υψηλά μικροδορυφορικά ασταθείς όγκους επέδειξαν καλή συμπεριφορά απέναντι στη θεραπεία με ιρινοτεκάνη, εν αντιθέσει με 7 από τους 65 ασθενείς με όγκους χαμηλής μικροδορυφορικής αστάθειας οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν σε θεραπεία με ιρινοτεκάνη. Μελέτες υποστηρίζουν πως η αγωγή με το φαρμακευτικό σχήμα οξαλιπλατίνη-λευκοβορίνη-φθοριουρακίλη (FOLFOX) σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας (>70) έχει την ίδια ανταπόκριση και σε ασθενείς μικρότερης ηλικίας και προτείνεται η χρήση της ανωτέρω φαρμακευτικής αγωγής ανεξαρτήτου ηλικίας. Διαφοροποιημένα είναι δεδομένα άλλης μελέτης η οποία δείχνει να εξατομικεύει την επιλογή της φαρμακευτικής αγωγής αναλόγως ηλικίας και ανοχής. [278] Αναφορικά στους ηλικιωμένους ασθενείς θεωρείται πως η παρηγορητική θεραπεία επιφέρει καλύτερα ποσοστά επιβίωσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, μας οδηγούν στα παρακάτω συμπεράσματα και παράλληλα σε νέα ερωτήματα και προοπτικές:

1. Τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (Mismatch Repair Genes) με τα παράγωγα προϊόντα τους, δηλαδή τις κωδικοποιημένες πρωτεΐνες τους, δεν φαίνεται να εμπλέκονται στις καλοήθεις παθήσεις του παχέος εντέρου όπως είναι οι μη νεοπλασματικοί πολύποδες και συγκεκριμένα οι υπερπλαστικοί πολύποδες που μελετήθηκαν και στην παρούσα εργασία.
2. Επίσης τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (Mismatch Repair Genes) δεν φαίνεται να εμπλέκονται ούτε και στην ανάπτυξη των αδενωματώδων πολύποδων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.
3. Στα περιστατικά σποραδικού καρκίνου παχέος εντέρου (ΚΠΕ) παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (Mismatch Repair Genes) σε διαφορετικά ποσοστά ανάλογα πάντα με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη.
4. Στα 48 περιστατικά αδενοκαρκινωμάτων από τα 50 έχουμε διατήρηση της έκφρασης των πρωτεϊνών. Σε δυο αδενοκαρκινώματα παρατηρούμε μείωση/απώλεια των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA ανάλογα πάντα με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη, που πάντως όμως δεν ξεπερνούν το 4%.
5. Συγκεκριμένα για το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου που αναπτύχθηκε περιφερικά σε αδενωματώδη πολύποδα υπήρχε πλήρης απουσία της έκφρασης των πρωτεϊνών MSH6 και PMS2 ενώ διατηρήθηκε κανονικά η έκφραση των πρωτεϊνών MLH1 και MSH2. Εξαιρετικά ενδιαφέρουσα αποδείχθηκε η συμπεριφορά του αδενωματώδη πολύποδα στον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο. Η έκφραση των MLH1 και MSH2 πρωτεϊνών διατηρήθηκε κανονικά, ενώ για τις πρωτεΐνες MSH6 και PMS2 παρατηρείται μείωση κατά το ήμισυ με ασθενή ανοσοχρώση σε ποσοστό <50% των νεοπλασματικών κυττάρων στον αδενωματώδη πολύποδα.
6. Στο δεύτερο αδενοκαρκίνωμα που επέδειξε απώλεια/μείωση MMR, παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών MSH6 και

PMS2 και μείωση της έκφρασης της MLH1 πρωτεΐνης και της MSH2 πρωτεΐνης αντίστοιχα.

7. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν πως τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA εμπλέκονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Αυτή η εμπλοκή διαφαίνεται να πραγματοποιείται σε κάποιο πρώιμο στάδιο της εξαλλαγής προς κακοήθεια, μιας και αναγνωρίστηκε μειωμένη έκφραση MMR και σε πολύποδα στον οποίο περιφερικά αναπτύχθηκε αδενοκαρκίνωμα. Είναι όμως δύσκολο και αποτελεί μεγάλη πρόκληση να εντοπιστεί το ακριβές σημείο της αντιγραφής του DNA στο οποίο πραγματοποιείται η απενεργοποίηση και η υπολειτουργικότητα των γονιδίων επιδιόρθωσης.
8. Η μειωμένη λειτουργικότητα αλλά και η απώλεια του συστήματος MMR επηρεάζει την πρόγνωση και τον τρόπο αντιμετώπισης της θεραπείας των ασθενών.
9. Η ανεπάρκεια του συστήματος MMR επηρεάζει και την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία για τη χρήση κατάλληλων χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Πολλά υποσχόμενο πεδίο αποτελεί η ανάπτυξη νέων φαρμάκων και φαρμακευτικών σχημάτων που θα μπορούν να επανενεργοποιούν το σύστημα MMR σε περίπτωση βλάβης ή και να το αντικαθιστούν με κάτι άλλο. Έτσι θα προσφέρονται στον ασθενή που δεν ανταποκρίνεται σε υπάρχοντα θεραπευτικά σχήματα εναλλακτικές και επιπλέον επιλογές.
10. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των βλαβών του συστήματος επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) αποτελεί γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο της εντόπισης των ασθενών που εμφανίζεται αυτή η γενετική ή επιγενετική αλλαγή. Αυτό κρίνεται σκόπιμο ώστε να αναγνωρίζονται οι φορείς των μεταλλάξεων των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA ώστε να υπάρχει καλύτερη αντιμετώπιση του ασθενούς προτού υπάρξει εξέλιξη σε κακοήθεια και πλήρης απώλεια των MMRP.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA (MMR) ΣΕ ΚΑΛΟΗΘΗ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ.

Το παχύ έντερο αποτελεί ένα όργανο του σώματος στο οποίο αναπτύσσεται πληθώρα παθήσεων καλοήθων και κακοήθων. Αρκετές από τις παθήσεις αυτές είναι αποτέλεσμα γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA. Οι πρωτεΐνες που μελετήσαμε είναι οι εξής τέσσερις: hMLH1, hMSH2, hMSH6 και hPMS2. Εμπλέκονται στον ίδιο μηχανισμό επιδιόρθωσης (mismatch repair system, MMR) σε καλοήθεις παθήσεις του παχέος εντέρου, σε προκαρκινικές αλλοιώσεις του παχέος εντέρου και στο σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην έκφραση των πρωτεϊνών από τα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα και οι μεταβολές που παρατηρούνται. Διερευνήσαμε με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας την έκφραση των δεικτών και έγινε και η ανάλογη συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Στη μελέτη μας εξετάστηκαν 9 περιστατικά υπερπλαστικού πολύποδα, 21 περιστατικά αδενωματοδών πολύποδων και 50 αδενοκαρκινώματα.

Δεν παρατηρήθηκε απώλεια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA στους υπερπλαστικούς πολύποδες. Δύο από τα εννέα περιστατικά (22.22%) εμφάνισαν μικρή μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6. Η πυρηνική χρώση ανέρχεται στο 80% των επιθηλιακών κυττάρων. Και πάλι υπήρχε έκφραση της πρωτεΐνης MSH6 στα δυο αυτά παρασκευάσματα απλά ελαφρώς μικρότερη.

Απώλεια της έκφρασης των MMR δε συναντήσαμε ούτε και στους αδενωματοδείς πολύποδες. Μικρή διαφοροποίηση εντοπίστηκε για το αντίσωμα MSH6, όπου η χρώση άγγιζε το ποσοστό του 100% στις 19 από τις 21 περιπτώσεις των αδενωμάτων. Στις υπόλοιπες δυο περιπτώσεις η ανοσοχρώση ήταν έντονη και εκφραζόταν σε

ποσοστό 50%-80% πάντα βέβαια σε σχέση με τα νεοπλασματικά κύτταρα. Η μια από τις δυο περιπτώσεις αφορούσε σε σωληνολαχνωτό αδένωμα παχέος εντέρου και η άλλη σε serrated adenoma -οδοντωτό αδένωμα-.

Στα περιστατικά των αδενοκαρκινωμάτων παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA σε ποσοστό 4% συνολικά. Το ποσοστό διαφοροποιείται ανάλογα με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα για το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου που αναπτύχθηκε περιφερικά σε αδενωματώδη πολύποδα υπήρχε πλήρης απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών MSH6 και PMS2 ενώ διατηρήθηκε κανονικά η έκφραση των πρωτεϊνών MLH1 και MSH2. Εξαιρετικά ενδιαφέρουσα αποδείχθηκε η συμπεριφορά του αδενωματώδη πολύποδα στον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο. Η έκφραση των MLH1 και MSH2 πρωτεϊνών διατηρήθηκε κανονικά, ενώ για τις πρωτεΐνες MSH6 και PMS2 παρατηρείται μείωση κατά το ήμισυ με ασθενή ανοσοχρώση σε ποσοστό < 50% των νεοπλασματικών κυττάρων στον αδενωματώδη πολύποδα. Στο δεύτερο αδενοκαρκίνωμα παρατηρήθηκε απώλεια και μείωση MMR, ανάλογα πάντα με την εξεταζόμενη πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών MSH6 και PMS2 και μείωση της έκφρασης της MLH1 πρωτεΐνης και της MSH2 πρωτεΐνης αντίστοιχα.. Επί του συνόλου των 50 αδενοκαρκινωμάτων παρατηρείται απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 και της MSH2 αντίστοιχα σε ποσοστό 4%. Επίσης παρατηρείται απώλεια έκφρασης της MLH1 πρωτεΐνης σε ποσοστό 2% και το ίδιο και για την έκφραση της πρωτεΐνης PMS2. Δεν μπορούμε να γνωρίζουμε σε ποιο σημείο της καρκινογένεσης ακριβώς εμφανίζεται η απώλεια της έκφρασης των MMR, ωστόσο υπάρχει υπόνοια ότι ίσως συμβαίνει σε πρώιμο στάδιο.

Οι υπάρχουσες εργασίες που ασχολούνται και μελετούν το σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA και την επίδρασή του στην παθολογία του παχέος εντέρου δεν είναι πάρα πολλές. Παρά το σχετικά μικρό αριθμό των μελετών η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων δείχνει να συμφωνούν μεταξύ τους. Η χρήση της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση των λαθών του συστήματος MMR κερδίζει συνεχώς όλο και περισσότερο έδαφος αποτελώντας μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την εντόπιση παθογόνου μετάλλαξης στα γονίδια επιδιόρθωσης και την εντόπιση ασθενών στους οποίους εμφανίζεται η διαταραχή αυτή.

Τα αποτελέσματα της εργασίας μας υποδεικνύουν πως τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA δεν φαίνεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη υπερπλαστικών πολυπόδων και αδενωματωδών πολυπόδων. Η διαταραχή του συστήματος επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA -MMR- φαίνεται να λαμβάνει χώρα σε πρώιμο βήμα της εξαλλαγής σε κακοήθεια χωρίς όμως να ξέρουμε σε ποιο σημείο ακριβώς της αντιγραφής του DNA παύει η λειτουργικότητά του. Έτσι αυτή η ανεπάρκεια του MMR συστήματος δυνητικά επηρεάζει την πρόγνωση και τον τρόπο αντιμετώπισης της θεραπείας των ασθενών.

ABSTRACT**STUDY OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF MISMATCH REPAIR GENES IN COLORECTAL CANCER. CORELATION WITH PROGNOSTIC MARKERS**

The pathology of the colon consists a great chapter in human pathology. Both benign and malignant lesions are thought to develop due to genetic and/or epigenetic defects. DNA repair system is considered to be one of the mechanisms involved in genetic instability.

The purpose of the present study was to investigate the expression of four of the proteins encoded by the DNA mismatch repair genes, namely MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2. These gene products are involved in the DNA repair system in benign colonic polyps as hyperplastic polyps, also in adenomas and colorectal cancer.

The expression of these proteins was monitored immunohistochemically in 9 hyperplastic polyps, 21 adenomas including a serrated adenoma and 50 cases of CRC which included a very interesting case of an adenocarcinoma which was developed around an adenoma.

We did not detect any loss of any of the four examined proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 expression in any of the hyperplastic polyps. In just two cases we detected a minor decrease/reduction of the expression of one of the four proteins examined, MSH6. The staining was in a percentage of 80% of the epithelial cells.

As far as the adenomas are concerned we did not detect either any loss of the four examined proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 expression. We also had a minor decrease /reduction of the expression of MSH6 protein. The staining was in between a width of 50%-80% but with great intensity always in comparison with the neoplastic cells. One of the adenomas which had the loss of the MMR protein MSH6, was a serrated adenoma.

Concerning all 50 cases of adenocarcinomas we detected loss of the mismatch repair proteins in 2% (MLH1), 2% (MSH2), 4% (MSH6), 4% (PMS2) in sporadic cases. The reduced or absent expression of these four proteins was not correlated either with

the age, the gender of the patients, the size of the confection or the lymphatic mets. Loss or reduction of the MMR proteins can be associated with poor survival prognosis.

The published data so far concerning the mismatch repair protein expression and its relationship with colorectal pathology come to an understanding as far as the results are concerned. Studies confirm that there is a high association between MMR deficiency and loss of expression of the related encoded proteins.

The technique of immunochemistry is a quite rapid, simple, accurate technique which can be used in a daily basis in order to detect patients that carry these disorders in the MMR system.

Our study results suggest that the DNA mismatch repair system is not involved in the polyps genesis, either benign or malignant. Though based on our results we suggest that the DNA mismatch repair system is involved in carcinogenesis in sporadic cases in a quite early event although it is not easy yet to predict in which timeline of the DNA replication exactly happens. The MMR deficiency affects prognosis and therefore management and therapeutic procedures of the patients.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Moore KL, Persaud TVN, Mark G. Torchia: The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1993
2. O' Rahilly R, Muller F: Developmental stages in Human Embryos, Washington, Carnegie Institute of Washington, 146-92, 1986
3. Gartner P. Leslie, James L. Hiatt, Εγχειρίδιο ιστολογίας, Εκδόσεις Παρισιάνου, 3^η Έκδοση, 2001, 280-83,292-97
4. Jack T.Stern, JR, Βασικές έννοιες της ανατομίας Ελληνική έκδοση, Εκδόσεις Παρισιάνος 2003, 46-51
5. Ackerman's Surgical Pathology, 10th edition by Juan Rosai, 2011
6. Wheater' s Functional Histology, 5th edition, A text and colour ATLAS/Barbara Young, James S. Lowe, Alan Stevens and John W. Heath, 2006
7. Histology for Pathologists by Stacey E. Mills, 2006, 723-789
8. Andres PG, Friedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. Gastroenterol, Clin Nort 1999 Jun; 28(2):255-81
9. Disease of the Colun & Rectum (DCR): American Society of Colon and Rectal Surgeons
10. Β.Μαλάμου Μήτση, Μ.Μπάη, Δ.Στεφάνου, Α.Μπατιστάτου, Α.Γούσια. Γενική και Ειδική Παθολογική Ανατομική, Ιωάννινα 2011, 451- 465
11. Sobotta: Άτλας Ανατομικής του Ανθρώπου: 1^η Ελλην. Έκδοση, Β'τόμος, Εκδόσεις Παριζιάνος 1978, 267
12. Anson B.J., Vay G. B. Surgical Anatomy, 5th ed. W. B. Saunder Company, Philadelpia, 745-834, 1972
13. Keighley M. R. B. and Williams S.N.: Surgery of the Anus, Rectum and colon: W. B. Saunders Company Volume II, 1128-1220, 1993
14. Astler V. B., Coller F. A. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann. Surgery 1954, 846-852
15. Kirsner J. B., Shorter R. G. Inflammatory bowel disease. Lea and Febiger, Philadelpia, 1975
16. Morris J.P. and Malt A. R. Oxford textbook of Surgery Volume I, Oxford University Press
17. Fenoglio-Preicer C, Pascal R: Hyperplastic polyp Gastrointestinal and Oesophageal Pathology, ed Whitehead 1st ed 1989:789.

18. Rosai R: Hyperplastic (metaplastic) polyp, Akerman's Surgical Pathology 8th ed, 1996:759-760.
19. Estrada G, Spjut J: Hyperplastic polyps of the large bowel. *Am J Surg Pathol* 1980; 4:127-33.
20. Murai N, Fukuzaki T, Nakamura T et al. Cronkite-Canada syndrome associated with carcinoma of colon cancer: report of a case. *Surg. Today* 1998;24(9):826-9
21. Kay PS, Soetikno RM, Mindelgum, Young HS et al. Diffuse esophageal glycogenic acanthosis (an endoscopic marker of Cowden's disease). *Am J Gastroenterol* 1997;92(6):139-42
22. Yamada K., Matsukawa A, Hori Y, et al. Ultrastructural studies on pigmented macules of the Peutz-Jeghers syndrome, *J Derm* 1981; 8: 367-377
23. Westerman AM, Wilson JHP et al. Peutz-Jeghers syndrome: risks of a hereditary condition, *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1999;230:64-70.
24. Smir BN, Pulitzer Dr et al, Multiple lymphomatous polyposis of the gut. A case with unusually widespread distribution. *J Clin Gastroenterol* 1994;1019(2):139-42
25. Moynihan MJ Bast MA, Chan WC et al. Lymphomatous polyposis. A neoplasm of either follicular mantle or germinal centre cell origin. *Am J Surg Path.* 1996;20(4):442-52
26. Morson and Dawson's Gastrointestinal Pathology, 3rd Edition. Benign Epithelial tumors and polyps, p. 563-593.
27. Arminski TC, McLean DW et al. Incidence and distribution of adenomatous polyps of the colon and rectum based on 1000 autopsy examinations. *Dis Colon Rectum* 1964;7:249
28. Watanabe T, Muto T, Sawada T et al. Flat adenoma as a precursor of colorectal carcinoma in hereditary non-polyposis colorectal carcinoma. *Cancer* 1996;77:627
29. Wolber RA, Owen DA, et al. Flat adenoma of the colon. *Human Pathol* 199;22:70
30. Boring CC, Squires TS, Tong T, et al. Cancer Statistics, 1991. *CA Cancer J Clin* 1991; 41:19-36.
31. Hill MJ. Aetiology of colorectal cancer: current concepts. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1989; 3:567-92.

32. Fenolio-Preiser, *Gastrointestinal Pathology*, chapter 20. Epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine, 954-955
33. Johnston P, Allegra G: Colorectal cancer biology: clinical implications. *Sem Oncol*, 22: 418-432, 1995
34. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, et al: American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 *Am J Gastroenterol*. 2009; 104:739
35. Knudson, A.G. Cancer genetics. *Am J Med Genet*. 2002 Jul 22;111(1):96-102.
36. Dekker E., Boparai K.S., Poley J.W., et al. High resolution endoscopy and the additional value of chromoendoscopy in the evaluation of duodenal adenomatosis in patients with familial adenomatous polyposis. *Endoscopy* 2009; 41(8): 666-9.
37. Douma K.F., Bleiker E.M., Aaronson N.K., et al. Long-term compliance with endoscopic surveillance advice for familial adenomatous polyposis (FAP). *Colorectal Dis* 2010; 12(12): 1198-1207.
38. Duncan R.E., Gillam L., Savulescu J., et al. The challenge of developmentally appropriate care: predictive genetic testing in young people for familial adenomatous polyposis. *Fam Cancer* 2010; 9(1): 27-35.
39. Iaquinto G., Fornasarig M., Quaia M., et al. Capsule endoscopy is useful and safe for small-bowel surveillance in familial adenomatous polyposis. *Gastrointest Endosc* 2008; 67(1):61-7.
40. Will O.C., Hansmann A., Phillips R.K., et al. Adrenal incidentaloma in familial adenomatous polyposis: a long-term follow-up study and schema for management. *Dis Colon Rectum* 2009; 52(9): 1637-44.
41. Aarnio M., Mecklin J.P., Aaltonen L.A., et al. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer*, 1995;64(6): 430-433.
42. Bliss C.M.Jr., Schroy P.C.3rd. et al. Endoscopic diagnosis and management of hereditary non polyposis colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20(5): 468-473.
43. Bonadona V., Bonaïti B., Olschwang S., et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011;305(22): 2304-2310.

44. Boland C.R., Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2073-2087.e3.
45. Dunlop M.G., Farrington S.M., Carothers A D., et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet.* 1997;6(1): 105-110.
46. Levin B., Lieberman D.A., McFarland B., et al. for the American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College. of Radiology Colon Cancer Committee. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008;134(5):1570-1595.
47. Chan TL, Wai Chan Y, Ho JW et al (2004) MSH2 c. 1452-1455delAATG is a founder mutation and an important cause of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer in the southern Chinese population .*Am J Hum Genet* 74:1035-1042
48. Chen S, Wang W, Lee S, Nafa K et al (2006) Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome *JAMA* 296:1479-1487
49. Foulkes W, Thiffault I, Gruber SB et al (2002) The founder mutation MSH2*1906G->C is an important cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Ashkenazi Jewish population *Am j Hum Genet* 71(6):1395-1412
50. Rodriguez-Bigaz MA, Boland CR, Hamilton SR et al (1997) A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89:1758-1762
51. Nomura A, Grove JS, Stemmermann GN et al : A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes and alcohol consumption. *Cancer Res.* 1990 :50 : 627-631
52. Trichopoulos D, Manousos O, Day NE et al : Diet and cancer : a case control study in Greece *Int. J Cancer* 1985; 36:291-297
53. Trichopoulou A, Tzonou A, Hsieh CC, et al : High protein, saturates fat and cholesterol diet, and low levels of serum lipids in colorectal cancer. *Int J Cancer* 1992;51:386-392

54. Franceschi S, La Vecchia C, Russo A, et al: Macronutrient intake and risk of colorectal cancer in Italy. *Int J Cancer* 1998 ; 76(3):321-4
55. Augustsson K, Skog K, Jagerst M et al: Dietary heterolytic amines and cancer of the colon, rectum , bladder and kidney : a population based study. *Lancet* 1999;353(9154):686-687
56. Franceschi S, Favero A, La Vecchia C, et al: Food groups and risk of colorectal cancer in Italy. *Int J Cancer* 1997 ; 72(1):56-61
57. La Vecchia C, Negri E, Decarli A, et al: Diabetes mellitus and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997 ; 6(12):1007-1010
58. Parker L : Protective role of vitamine E in biological systems *Am J Clin Nutr.* 1991 ; 53 : 1050 – 1055
59. Shibata A, Paganini-Hill A, Roos RK, et al: Intake of vegetables, fruit, beta carotene, vitamin C and vitamine supplements and cancer incidence among the elderly : a prospective study. *Br J Cancer* 1992; 66:673-679
60. Buset M, Lipkin M, Winawer SJ, et al. Inhibition of human colonic cell proliferation in vitro and in vivo by calcium. *Cancer Res* 1986 ; 46:5426
61. Slattery ML, Caan BJ, Potter TD, et al : Dietary energy sources and colon cancer risk. *Am J Epidemiol* 1997;145(3):199-210
62. Levi F, Pasche C, La Vecchia C, et al: Food group and colorectal cancer risk. *Br J Cancer* 1999; 79(7-8): 1283-7
63. Le Marchand L, Willkens LR, Hankin JH et al; A case control study of diet and colorectal cancer in a multiethnic population in Hawaii (United States) : lipids and food of animal origin. *Cancer Causes Control* 1997; 75(9):1381-4
64. Manousos O, Day NE, Trichopoulos D, et al: Diet and colorectal cancer. A case control study in Greece . *Int J Cancer* 1983; 32:1-5
65. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. A prospective study of cigarettes smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. men *J. Natl Cancer Inst* 1994;86: 183-91
66. Knekt P, Hakama M, Jarvinen R, et al Smoking and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;78:136-9
67. McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:687–95.

68. Lagiou P, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Nutritional epidemiology of cancer: accomplishments and prospects. *Proceeding of the Nutrition Society*. 2002 May;61(2):217-22
69. Navtej S. Buttar, MBBS, Kenneth K. Wang, MD et al (2000):The “Aspirin” of the New Millennium: Cyclooxygenase-2 Inhibitors
70. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C., et al Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Feb 20;94(4):252-66.
71. Taketo M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II). *J Natl Cancer Inst*1998;90:1609–20.
72. Janne PA, Mayer RJ, et al. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl j Med* 2000;342:1960–8.
73. Vane JR, Flower RJ, Botting RM,et al . History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke* 1990;21(12 Suppl 4):12–23.
74. H, Schut HA, Conran P, Kramer PM, et al. Prevention by aspirin and its combination with α -difluoromethylornithine of azoxymethane-induced tumors, aberrant crypt foci and prostaglandin E₂ levels in rat colon. *Carcinogenesis* 1999; 20:425–30.
75. Reddy BS, Nayini J, Tokumo K, et.al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by concurrent administration of piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug with D, L- α -difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor, in diet. *Cancer Res* 1990; 50:2562–8.
76. Rao CV, Rivenson A, Simi B, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res* 1995; 55:1464–72.
77. Peterson WL, Cryer B.et al. COX-1-sparing NSAIDs—is the enthusiasm justified? *JAMA* 1999; 282:1961–3.
78. Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR,et al . COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000; 355:646–8.
79. Newcomb PA, Storer BE. Postmenopausal hormone use and risk of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995 Sep 20;87(18):1416.

80. Calle E. E., H. L. Miracle-Mcmahill et. al. (1995) “Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of post menopausal women.” *J. Natl. Cancer Inst*:87:517-23
81. Chute, C.G., W.C. Willet, et al.(1991). “A prospective study of reproductive history and exogenous estrogens on the risk of colorectal cancer in women” *Epidemiology* 2:201-7
82. Fernandez, E., C. La Vecchia, et al. (1998). “Hormone replacement therapy and risk of colon and rectal cancer.” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7(4): 329-33
83. Gerhardsson de Verdier, M. and S. London (1992). “Reproductive factors, exogenous female hormones, and colorectal cancer by subsite.” *Cancer Causes Control* 3: 355-360
84. Jacobson, J.S., A.I. Neugut, et al. (1995). “Reproductive risk factors for colorectal adenomatous polyps (New York City, NY, United States). *Cancer Causes Control* 6(6):513-8
85. Issa J.P., Y.L. Ottaviano, et al (1994). “Methylation of the oestrogen receptor CpG Island links ageing and neoplasia in human colon.” *Nat Genet* 7(4): 536-40
86. Cerea G, Vaghi M, Ardizzoia A, et al. Biomodulation of cancer chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomized study of weekly low-dose irinotecan alone versus irinotecan plus the oncostatic pineal hormone melatonin in metastatic colorectal cancer patients progressing on 5-fluorouracil-containing combinations. *Anticancer Res.*2003; 23:1951-1954.
87. Davis S, Mirick DK. Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control.* 2006; 17:539-545.
88. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:825–828.
89. Alfred M. Conen, Sidney J. Winawer, Michael A. Friedman, et al. Cancer of the colon, rectum and anus. Εκδόσεις Mc Graw-Hill Inc. 1995, 371-375,743-745.
90. Winawer SJ, Schottenfeld D, Flehinger BJ et al. Colorectal cancer screening. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:243-53.

91. R.F. Theoni, A.A. Moss, P. Scinyder et al. Detection and staging of primary restal and rectosigmoid cancer by computer tomography *Radiology* 1981,141:135-138
92. Frazier AL, Colditz GA, Fuchs CS, et al. Cost-effectiveness of screening for colorectal cancer in the general population. *JAMA*. 2000; 284:1954–1961.
93. Levin B, Lieberman DA, McFarland, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*. 2008; 58:130–160.
94. Rex DK, Chak A, Vasudeva R, et al. Prospective determination of distal colon findings in average-risk patients with proximal colon cancer. *Gastrointest Endosc* 1999; 49:727-730.
95. Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, et al. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *N Engl J Med* 2000; 343:162-168.
96. Rex DK, Rahmani EY, Haseman JH et al. Relative sensitivity of colonoscopy and barium enema for detection of colorectal cancer in clinical practice. *Gastroenterology* 1997;112:17-23
97. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, et al. American College of Gastroenterology Guidelines for Colorectal Cancer Screening 2008. *Am J Gastroenterol* 2009;104:739-750
98. Burt R: Familial risk and colorectal cancer. *Gastrent Clin N Am*, 25: 793-803, 1996
99. Johnston P, Allegra G et al: Colorectal cancer biology: clinical implications. *Sem Oncol*, 22: 418-432, 1995
100. Hamilton SR, Lauri A. Aaltonen et al: Carcinoma of Colon and rectum στο WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon, France: IARC Press; 2010:132-146
101. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, et al. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:739
102. Williams G, Quirke P, Shepherd N. et all. Dataset for Colorectal Cancer, 2nd edn. The Royal College of Pathologists, 2007.

103. Hellenic GIT Pathology Group. Working team: Arapadoni P, Barbatis C, Demonakou M, et al. Pilot European protocol for adenocarcinoma of large bowel (EPPALB): the Greek experience. *Virch Arch* 2001; 439:238–239.
104. Hanahan D, Weinberg RA (January 2000). "The Hallmarks of Cancer". *Cell* 100 (1): 57–70.
105. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
106. Battegay EJ et al. Angiogenesis: Mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.* 1995; 73:333-346.
107. Venook AP, Curley SA. Et al. Management of potentially resectable colorectal cancer liver metastases. *Up-To-Date* 2011; 19:3.
108. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics
109. Alfred M. Conen, Sidney J. Winawer, Michael A. Friedman, et al. Cancer of the colon, rectum and anus. Mc Graw-Hill Inc. 1995, 371-375,743-745.
110. Cady B.: The changing role of the surgical oncologist. *Surg Clin North Am* 2000, 80: 459-469.
111. Rose M.G., Farrell M.P., and Schmitz J.C. et al: Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer* 2002, 1: 220-229.
112. De Gramont A., Vignoud J., Tourmigand C., et al. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1997, 33: 214- 219.
113. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., et al: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004, 350: 2335-2342.
114. André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009; 27:3109.
115. Houghton P.J., Cheshire P.J., Hallman J.C. et al.: Therapeutic efficacy of the topoisomerase I inhibitor 7-ethyl-10-(4-[1-piperidino]-1-piperidino)-carbonyloxy-camptothecin against human tumor xenografts: lack of cross-resistance in vivo in tumors with acquired resistance to the topoisomerase I inhibitor 9-dimethylaminomethyl-10- hydroxycamptothecin. *Cancer Res* 1993, 53: 2823-2829.

116. Schrock T.R.: Large intestine. Current Surgical Diagnosis and Treatment, Edr Lawrence W. Way, Lange Medical Publications, Ninth Edition, 1991: 633-680.
117. Compton CC. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic and molecular features. *Mod Pathology* 2003; 16 (4):376-38
118. Compton CC et al. AJCC Prognostic Factors Consensus Conference, Colorectal Working Group. *Cancer* 2000; 88:1739-1757
119. Shepherd N, Baxter K, Love S, et al. The prognostic importance of peritoneal involvement in colon cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1997; 112:1096-102
120. Herrera-Ornelas L, Justiniano J, Castillo N et al. Metastases in small lymph nodes from colon cancer. *Arch Surg* 1987; 122: 1253-6
121. Tepper JE, O'Connell MJ et al. Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:157-63
122. Rubin P. A unified classification of cancers: an oncotaxonomy with symbols. *Cancer* 1973; 31:963-82.
123. Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Colorectal tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, Eds. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2001:583-612
124. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Genetic instability in colorectal cancers, *Nature* 1997;386:623-7
125. Fearon ER, Bommer GT, et al. Molecular biology of colorectal cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2008:1218-31
126. Barber TD, McManus K, Yen KW, et al. Chromatoid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3443-8
127. Peltomaki P: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21:1174-1179,2003
128. Jiricny J. Et al. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:335-346,2006
129. Aaltonen LA, Peltomaki P, Schaid D, et al: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260:812-816, 1993

130. Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000;118:829-34
131. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the MLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808-11
132. Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-5
133. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Sci U S A* 1998;95:8698-702
134. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:988-93
135. Kondo Y, Issa JP, et al. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:29-39
136. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8681-6
137. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and it is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93
138. Ionov Y, Peinado M, Malkhosyan S, Shibata D, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeats sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-61
139. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-19
140. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A national Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57
141. Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL et al. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-high tumors. *Dis Markers* 2004; 20:237-50

142. Perucho M, Correspodence RE, Boland CR et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer 1999; 59:249-56
143. Suraweera N, Duval A, Reperant M et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804-11
144. Xicola RM, Llorr X, Pons E et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2007;7:244-52
145. Murphy KM, Zhang S, Geiger T et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn* 2006; 8:305-11
146. Vogelstein, B, Lane, D. & Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* 408. 307 310 (2000).
147. Grady WM, Markowitz S. Colorectal cancer: genetic alterations. In: Kelsen D, Daly J, Kern S, Levin B, Tepper J, eds. *Gastrointestinal oncology: principles an practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2008:1218-31
148. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, et all. Suppression of human colorectal carcinoma cell-growth by wild-type p53. *Science* 1990;249:912-5
149. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217-21
150. Vasquez A, Bond EE, Levine J, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:979-87
151. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. p53 Gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50:717-22
152. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-8
153. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor β receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 1999;59:320-4

154. Grady WM, Markowitz SD. TGF- β signaling pathway and tumor suppression. In: Derynck R, Miyazano K, Eds. The TGF- β family. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008:889-938
155. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314:268-74
156. Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318:1108-13
157. Grady WM, Rajput A, Myeroff LL, et al. Mutation of the type II transforming growth factor- β receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:3101-4
158. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al (August 1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients". *Science* 253 (5020): 665-9.
159. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997; 275:1784-7.
160. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275:1787-90.
161. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor β receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *CancerRes* 1999; 59:320-4.
162. Grady WM, Markowitz SD. TGF- β signaling pathway and tumor suppression. In: Derynck R, Miyazano K, Eds. The TGF- β family. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008:889-938
163. Goss KH, Groden J. et al Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18:1967-79.
164. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-30
165. Nakamura, T; Hamada F, Ishidate T, et al (Jun 1998). "Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3 β and APC and reduces the beta-catenin level". *Genes Cells* 3 (6): 395-403.
166. Su, L K; Vogelstein B, Kinzler K W (Dec 1993). "Association of the APC tumor suppressor protein with catenins". *Science* 262 (5140): 1734-7

167. Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Jun 7;1332(3):F127–F147.
168. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 2008;7:27-39
169. Malik MA, Gupta A, Zargar SA, Mittal B. Role of genetic variants of deleted in colorectal carcinoma (DCC) polymorphisms and esophageal and gastric cancers risk in Kashmir Valley and meta-analysis. *Tumour Biol* 2013 Oct;34(5):3049-57.
170. George B, Kopetz S. et al, Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep*. 2011 Jun;13(3):206-15.
171. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, et al (March 2006). "Colorectal cancer: genetics of development and metastasis". *J Gastroenterol*. 41 (3): 185–92.
172. Omerovic J, Laude AJ, Prior IA. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(19-20):2575-89.
173. Mitin N, Rossman K.L, Der C.J, Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol* 15, 563-574.
174. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327:293-7.
175. Arnaud D. Roth, Sabine Tejpar, Mauro Delorenzi, et al. Prognostic Role of KRAS and BRAF in Stage II and III Resected Colon Cancer: Results of the Translational Study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial, *J. clin. Oncol*. 2010 28:466
176. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al, Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1; 26(10):1626-34.
177. Baselga J, Rosen N. Determinants of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Agents, *J Clin Oncol* 26, No 10, 2008: 1582-84.
178. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al: Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934, 2002
179. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F et al; Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic

- colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* 2007;67(6):2643-8.
180. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F et al; Wild-Type BRAF Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*, 26, 2008: 5705-5712.
 181. Jolien Tol, Iris D. Nagtegaal, Cornelis J.A. Punt, *BRAF* Mutation in Metastatic Colorectal Cancer, *N Engl J Med* 2009; 361:98-99
 182. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, et al, Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2011-9
 183. Nosho K, Irahara N, Shima K, et al. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population based sample. *PLoS One* 2008;3(11):e3698.
 184. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304:554
 185. Xiaoyun Liao, Paul Lochhead, Reiko Nishihara, et al, Aspirin Use, Tumor PIK3CA Mutation, and Colorectal-Cancer Survival, *N Engl J Med* October 25, 2012; 367:1596-1606
 186. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19:183–232
 187. Baselga J, Rosen N. Determinants of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Agents, *J Clin Oncol* 26, No 10, 2008: 1582-84.
 188. Giacomelli L, Gianni W, Belfiore C, Gandini O, et al Persistence of epidermal growth factor receptor and interleukin 10 in blood of colorectal cancer patients after surgery identifies patients with high risk to relapse. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul; 9(7):2678-82.
 189. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR et al. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocrine-Related Cancer* (2003) 10 1–21
 190. Leung DW, Cachianes G, Klagsbrun W, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246: 1306-9

191. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM., Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist*. 2000;5 Suppl 1:11-5.
192. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56:549-80
193. Nakamura Y, Tanaka F, Yoshikawa Y, et all. PDGF-BB is a novel prognostic factor in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008 Aug;15(8):2129-36
194. Yu J, Ustach C, Kim HR: Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Bio* 2003, 36(1):49-59.
195. Wang D, DuBois RN. Et al, An inflammatory mediator, prostaglandin E2, in colorectal cancer. *Cancer J*. 2013 Nov-Dec;19(6):502-10
196. Roelofs HM, Te Morsche RH, van Heumen BW, et all Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol*. 2014 Jan 2;14(1):1
197. Godwin JS, Prostaglandins and host diffence in cancer. *Med. Clin. North. Amer.* 65:829-844,1981
198. Hompson JA, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 1991; 5:344-366.
199. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissue. *Semin Cancer Biol* 1999;9:67-81.
200. Wilson APM, van Dalen A, Sibley PEC, Kasper LA, et all Multicenter tumour marker reference range study. *Anticancer Res* 1999; 19:2749-2752.
201. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965;121:439-462.
202. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965;122:467-481.
203. Boucher D, Cournoyer D, Stanners CP, et al Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res*1989; 49:847-852.
204. Begent RHJ. The value of carcinoembryonic antigen measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 1984;21:231-238.

205. Sugarbaker PH. Carcinoembryonic antigen (CEA) assays in obstructive colorectal cancer. *Ann Surg* 1976;184:752-757.
206. Pinto D, Clevers H., Wnt, stem cells and cancer in the intestine. Hubrecht Laboratory, Netherlands Institute for Developmental Biology, 3584 CT Utrecht, The Netherlands, 2005 Mar;97(3):185-96
207. Rajaraman R, Guernsey DL, Rajaraman MM, et al. Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer. Department of Medicine, Division of Hematology, Dalhousie University, *Cancer Cell Int.* 2006 Nov 8;6:25.
208. Boman BM, Huang E. Human coloncancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinalncology. *J Clin Oncol* 2008;26:2828-38.
209. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, PilozziE, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.
210. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10158-63.
211. Carrithers, S.L., Barber, M.T., Biswas, S., et all (1996). Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol.93, No.25, (Dec 1996), pp. 14827-14832
212. Waldman, S.A., Cagir, B., Rakinic, J., et all (1998). Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. *Dis Colon Rectum*, Vol.41, No.3, (March 1998), 310-315
213. Β.Μαλάμου Μήτση, Μ.Μπάη, Δ.Στεφάνου, Α.Μπατιστάτου, Α.Γούσια. Γενική και Ειδική Παθολογική Ανατομική, Ιωάννινα 2011, 461- 465
214. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al: Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant *Am J Hum Genet* 70: 26-37,2002
215. Vasen HF, Wijnen JT, Menko JF et al: Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 110: 1020-1027,1996
216. Andersen SD, Liberti SE, Lützen A, et al. Functional characterization of MLH1 missense variants identified in Lynch syndrome patients. *Hum Mutat.* 2012 33(12):1647-55

217. Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, et al. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology*. 2005 Aug; 129(2):537-49.
218. Dowty JG, Win AK, Buchanan DD, et al. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. *Hum Mutat*. 2013 Mar;34(3):490-7
219. Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, C. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a huGE review. *Am J Epidemiol*. 2002 Nov 15;156(10):885-902
220. Pande M, Wei C, and Chen J, et al. Cancer spectrum in DNA mismatch repair gene mutation carriers: results from a hospital based Lynch syndrome registry. *Fam Cancer*. 2012 Sep;11(3):441-7
221. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer*. 2005;4(4):323-33
222. Lützen A, de Wind N, Georgijevic D, et al. Functional analysis of HNPCC-related missense mutations in MSH2. *Mutat Res*. 2008 Oct 14; 645(1-2):44-55.
223. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6; 348(10):919-32.
224. Peltomäki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer*. 2005;4(3):227-32
225. Lützen A, de Wind N, Georgijevic D, Nielsen FC, et al. Functional analysis of HNPCC-related missense mutations in MSH2. *Mutat Res*. 2008 Oct 14;645(1-2):44-55
226. Cederquist K, Emanuelsson M, Göransson I, et al. Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden. *Int J Cancer*. 2004 Apr 10; 109(3):370-6. Erratum in: *Int J Cancer*. 2005 Jul 20;115(6):1011
227. Cohen MM Jr. Molecular dimensions of gastrointestinal tumors: some thoughts for digestion. *Am J Med Genet A*. 2003 Nov 1;122A(4):303-14
228. Edelbrock MA, Kaliyaperumal S, Williams KJ. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutat Res*. 2013 Mar-Apr;743-744:53-66

229. Gill S, Lindor NM, Burgart LJ, et al. Isolated loss of PMS2 expression in colorectal cancers: frequency, patient age, and familial aggregation. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6466-71
230. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology*. 2006 Feb;130(2):312-22
231. Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, et al. Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):4721-7
232. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology*. 2008 Aug;135(2):419-28
233. Vaughn CP, Baker CL, Samowitz WS, et al. The frequency of previously undetectable deletions involving 3' Exons of the PMS2 gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Jan;52(1):107-12
234. American Cancer Society. Available at <http://www.cancer.org/index>. 2009
235. Bonadona V., Bonaïti B., Olschwang S., et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011; 305(22): 2304-2310.
236. Boland C.R., Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6): 2073-2087.
237. Dunlop M.G., Farrington S.M. , Carothers A D., et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(1): 105-110.
238. Lothe R.A., Peltomaki P., Meling G.I., et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53(24): 5849-5852
239. Rodriguez-Bigas M.A., Boland C.R., Hamilton S.R., et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(23):1758-1762
240. Starostik P and Müller-Hermelink HK (2001) Diagnosis of microsatellite instability-positive colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 1:71-80.

241. Lynch HT and de la Chapelle A. (1999) Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 36:801-818
242. Kolodner RD, Marsischky GT. (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev.* 9:89-96.
243. Halford S, Sasieni P, Rowan A, et al (2002) Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 62:53-7.
244. Sinicrope FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol.* 2009;21:369-373
245. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP (1996) Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 110:682-687.
246. Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA *et al* (1998) Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer* 83: 259-266.
247. Davis TW, Wilson-Van Patten C, Meyers M, et al (1998) Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer Res* 58:767-778.
248. Popat S, Hubner R, Houlston RS Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23(3):609-618
249. Karnes WE Jr, Shattuck-Brandt R, Burgart LJ, et al (1998) Reduced COX-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair. *Cancer Res* 58:5473-5437.
250. Davis TW, Wilson-Van Patten C, Meyers M, et al (1998) Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer Res* 58:767-778.
251. Ng K, Schrag D Microsatellite instability and adjuvant fluorouracil chemotherapy: a mismatch? *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3207-3210
252. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer *N Engl J Med.* 2003;349(3):247-257
253. Debniak T, Kurzawski G, Gorski B, et al. Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:49-54

254. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001; 69:780–90?
255. Pinol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293:1986–94.
256. Southey MC, Jenkins MA, Mead L, et al. Use of molecular tumor characteristics to prioritize mismatch repair gene testing in early-onset colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:6524–32.
257. Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med* 2006; 354:2751–63.
258. Engel C, Forberg C, Holinski-Feder E, et al. Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 118:115–22.
259. Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Loretelli C, Piga A, Bearzi I, Cellerino R, Porfiri E. Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression. *J Clin Oncol* 2002; 20:1203–8.
260. De Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:972–80
261. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005;24:3995–8
262. Mihai Ioana, Christina Angelescu, Florin Burada, et al. MMR Gene Expression Pattern in Sporadic Colorectal Cancer, University of Medicine And Pharmacy Craiova, Romania, *J Gastrointest Liver Dis.* 2010
263. Kumarasinghe AP, de Boer B, Bateman AC, Kumarasinghe MP. DNA mismatch repair enzyme immunohistochemistry in colorectal cancer: a comparison of biopsy and resection material. *Pathology.* 2010;42(5):414-20

264. Cristopher D. South, Martha Yearsley, Edward Martin, et all. Immunohistochemistry staining for the mismatch repair proteins in the clinical care of patients with colorectal cancer, The Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Columbus, Ohio, *Genet Med.* 2009 Nov;11(11):812-7.
265. Matthew B. Yurgelun, Goel A, Hornick JL, et all. Microsatellite instability and DNA mismatch repair protein deficiency in Lynch syndrome colorectal polyps. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012 Apr;5(4):574-82.
266. Molaei M, Yadollahzadeh M, Almasi S, ET all. Sporadic colorectal polyps and mismatch repair proteins. *Indian J Pathol Microbiol.* 2011 Oct-Dec;54(4):725-9
267. Nasir Kamat, Mohammed A.Khidhir, Mouied M.Alashari, Ulf Rannug, Microsatellite instability and loss of heterozygosity detected in middle-aged patients with sporadic colon cancer: A retrospective study, *Oncol. Lett* 2013 November; 6(5):1413-1420
268. Gurjeet Kaur, Abdelhafid Masoud N. Raihan, M. Radzi, et all. Mismatch Repair Genes Expression defects & association with clinicopathological characteristics in colorectal carcinoma. *Indian J Med Res.* 2011 August; 134(2): 186–192
269. Clemens Schafmayer, Stephan Buch, Jan Hendrik Egberts, et all. Genetic investigation of DNA-repair pathway genes PMS2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, OGG1 and MTH1 in sporadic colon cancer, *Cancer Genetic*, April 2007
270. Vymetalkova VP, Slyskova J, Korenkova V, et all Molecular characteristics of mismatch repair genes in sporadic colorectal tumors in Czech patients, *BMC Med Genet.* 2014 Jan 31;15:17
271. Geoffrey Hall, Adele Clarkson, Amanda Shi, et all. Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma, *Pathology*(August 2010) 42(5).pp 409-413
272. Dove-Edwin I, de Jong AE, Adams J, et all. Prospective results of surveillance colonoscopy in dominant familial colorectal cancer with and without Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2006;130:1995–2000

273. Schmeler KM, Lynch HT, Chen LM, et al. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. *N Engl J Med* 2006; 354:261–9.
274. Syngal S., Weeks J.C., Schrag D., et al. Benefits of colonoscopic surveillance and prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer mutations. *Ann Intern Med* 1998;129(10):787-796.
275. Weiser MR, Jarnagin WR, Saltz LB. Colorectal cancer patients with oligometastatic liver disease: what is the optimal approach? *Oncology (Williston Park)*. 2013 Nov;27(11):1074-8.
276. Eckhanser EF, Knol AJ. Surgery for Primary and metastatic colo-rectal cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* 26(1):103-128 1997
277. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 1999;117:123–31
278. Hamza S, Bouvier AM, Rollet F, et al. Toxicity of Oxaliplatin Plus Fluorouracil/Leucovorin Adjuvant Chemotherapy in Elderly Patients with Stage III Colon Cancer: A Population-Based Study. *Ann Surg Oncol*. 2014 Mar 18
279. Peter C Kurniali, Borys Hrinchenko, Anas Al-Janadi, Management of locally advanced and metastatic colon cancer in elderly patients. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 28;20(8):1910-1922.