

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Β' ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΔΕΛΗΒΕΛΙΩΤΗΣ

“ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ
ΡΙ3Κ/ΑΚΤ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ”

ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΚΑΧΡΙΑΛΑΣ
Χειρουργός Ουρολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΩΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΠΙΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ'ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Σ'ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΘΕΕΣ, ΠΟΥ ΒΑΖΩ ΜΑΡΤΥΡΕΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ. ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΝΩ ΚΟΙΝΩΝΟ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΠΡΟΣΦΕΡΩ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΚΑ ΜΟΥ ΟΤΙ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ. ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΑΝ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΝΑ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΜΙΣΘΟ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑ. ΟΤΙ ΘΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΤΟΥΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ, ΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΠΙΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΜΟΥ, ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΤΟΥ ΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΣΕ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΧΟΥΝ ΣΥΝΔΕΘΕΙ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΜΕ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ, ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΙΑΤΡΩΝ, ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ ΑΛΛΟ. ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ, ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ. ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΟΠΩΣΔΗΠΟΤΕ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΤΡΑ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΞΑΣΚΗΜΕΝΟΥΣ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Ή ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ ΣΕ ΣΩΜΑΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ Ή ΔΟΥΛΩΝ. ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Ή ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ Ή ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ. ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

Τα μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

α. Χ. Δεληβελιώτης Καθηγητής Ουρολογίας Παν/μιου Αθηνών

β. Ι. Καστριώτης Αν. Καθηγητής Ουρολογίας Παν/μιου Αθηνών

γ. Α. Παπατσώρης Αν. Καθηγητής Ουρολογίας Παν/μιου Αθηνών (Επιβλέπων)

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 1/2017

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς επιτροπής: 1/2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στους σεβαστούς:

**Καθηγητή Χ. Δεληβελιώτη
Αν. Καθηγητή Ι. Καστριώτη
Αν. Καθηγητή Α. Παπατσώρη
κ. Γ. Βουτσινά,
κ. Γ. Αλιβιζάτο,
κ. Μ. Χόρτη**

**Στην οικογενειά μου
(πατέρα, μητέρα, σύζυγο, γιαγιά)**

Αφιέρωση

Στους γονείς, σύζυγο και γιό

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Mr Stefanos Kachrilas MD FEBU FHUA FES FCRS (Eng) Consultant Urological Surgeon

Ο ιατρός κ. Στέφανος Καχρύλας γεννήθηκε στις 10/12/1974 στην Αθήνα. Φοίτησε Ιατρική στο Universitate de Medicina et Farmacie Victor Babes, Τιμσοάρα, Ρουμανία μεταξύ 1992-1998, όπου και έλαβε με το πέρας των σπουδών του, τον τίτλο του Medical Doctor (MD), με βαθμό άριστα. Στην συνέχεια αναγνώρισε τον τίτλο της Ιατρικής στην Ελλάδα, έπειτα από σχετικές εξετάσεις στο Διαπανεπιστημιακού Κέντρο Αναγνώρισεως Τίτλων Σπουδών της Αλλοδαπής. Ξεκίνησε την βασική του εκπαίδευση στην Χειρουργική στην Πολυκλινική Αθηνών το 2004, έχοντας συμπληρώσει την σχετική προπαιδεία υπαίθρου μεταξύ 2001-2003. Από το 2007 έως το 2011 επιτέλεσε ως ειδικευόμενος Ουρολογίας στο Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο της Νίκαιας Αθηνών. Σε αυτή την περίοδο είχε την τιμή να είναι υποψήφιος Διδάκτωρ του Πανεπιστημίου Αθηνών και στα πλαίσια της Διδακτορικής του διατριβής που αφορά μοριακά μονοπάτια στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, συνεργάστηκε ως ερευνητής με το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”, στο τμήμα Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης. Παρακολούθησε και ολοκλήρωσε με επιτυχία στην συνέχεια τον κύκλο μαθημάτων της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας (European Association of Urology-EAU) και έλαβε έπειτα από προφορικές και γραπτές εξετάσεις την πιστοποίηση και τον τίτλο του “Fellow of the European Board of Urology” (FEBU) από το Ευρωπαϊκό Ουρολογικό Συμβούλιο (European Board of Urology-EBU).

Μετά το πέρας της βασικής του εκπαίδευσης στην Ουρολογία στην Ελλάδα, μετεκπαιδεύτηκε στην Ενδοουρολογία, Λιθίαση και Λαπαροσκοπική Χειρουργική στο διεθνούς φήμης Πανεπιστημιακό Βασιλικό Νοσοκομείο του Λονδίνου (The Royal London Hospital, Bart’s Health NHS Trust, London, UK). Με την ολοκλήρωση της μετεκπαίδευσης του έλαβε την πιστοποίηση και τον τίτλο του “Fellow of the Endourology Society” (FES), καθώς η Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Βασιλικού Νοσοκομείου του Λονδίνου αποτελεί Κέντρο Αναφοράς για Λιθίαση και Ενδοουρολογία και χαίρει πιστοποίησης από το Ευρωπαϊκό Ουρολογικό Συμβούλιο (European Board of Urology-EBU) και την Ευρωπαϊκή Ουρολογική Εταιρεία (European Association of Urology-EAU) ως πρότυπο Κέντρο Εκπαίδευσης στην Ενδοουρολογία και Λιθίαση (Centre of Excellence in Endourology). Στα πλαίσια αυτής της μετεκπαίδευσης του ο ιατρός κ.Καχρύλας, απέκτησε επίσης σημαντική εμπειρία στην ΝευροΟυρολογία, Ουροδυναμικό και Βιντεο-Ουροδυναμικό έλεγχο καθώς και στην χειρουργική αντιμετώπιση της Ακράτειας ούρων.

Κατόπιν μετεκπαιδεύτηκε στο παγκοσμίως γνωστό Πανεπιστημιακό Κολεγιακό Νοσοκομείο του Λονδίνου (University College of London Hospital, UCLH) στην Ανδρολογία με κυρίως αντικείμενο την χειρουργική αντιμετώπιση της Στυτικής Δυσλειτουργίας και της Ανδρικής Υπογονιμότητας. Το Ανδρολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Κολεγιακού Νοσοκομείου του Λονδίνου αποτελεί Κέντρο Αναφοράς για Ανδρολογικά νοσήματα και χαίρει πιστοποίησης από το Ευρωπαϊκό Ουρολογικό Συμβούλιο (European Board of Urology-EBU) και την Ευρωπαϊκή Ουρολογική Εταιρεία (European Association of Urology-EAU) ως πρότυπο Κέντρο Εκπαίδευσης στην Ανδρολογία. Στις αρχές του 2014 έλαβε θέση L.Consultant στο Πανεπιστημιακό Βασιλικό Νοσοκομείο του Λονδίνου όπου και εκτέλεσε καθήκοντα έως το τέλος του 2014. Τα τελευταία 3 έτη εργάστηκε ως L.Consultant στην Ουρολογία σε Πανεπιστημιακά Νοσοκομεία όπως το Πανεπιστημιακό Βασιλικό Κολεγιακό Νοσοκομείο (King’s College University Hospitals NHS Trust) και επί του παρόντος εργάζεται ως L.Consultant στην Ουρολογία στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Μπράιτ (Brighton University Hospital, BSUH NHS Trust) και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Βασιλέως Γεωργίου του Λονδίνου (King George University Hospitals, BHR NHS Trust). Ο κ. Καχρύλας κατέχει εκτενές επιστημονικό και συγγραφικό έργο, καθώς έχει συγγράψει και δημοσιεύσει 10 επιστημονικά συγγράμματα Ουρολογίας και πάνω από 100 επιστημονικά άρθρα και αναρτημένες ανακοινώσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και συνέδρια. Έχει την τιμή να είναι ορισμένος κριτής σε πλήθος Διεθνών Ιατρικών περιοδικών.

Ο κ. Καχρύλας έχει 29 δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά του PubMed:

- 1: Buchholz NN, El Howairis Mel F, Durner L, Harry D, Kachrilas S, Rodgers AL, Hakenberg O. Acceptance of mixed scientific and clinical activities in a sub-speciality urology meeting. *Urolithiasis*. 2015 Apr;43(2):101-5. doi: 10.1007/s00240-015-0759-3. Epub 2015 Feb 24. PubMed PMID: 25707476.
- 2: Stasinou T, Bourdounis A, Owegie P, Kachrilas S, Buchholz N, Masood J. Calcification of the vas deferens and seminal vesicles: a review. *Can J Urol*. 2015 Feb;22(1):7594-8. Review. PubMed PMID: 25694005
- 3: Kachrilas S, Popov E, Bourdounis A, Akhter W, El Howairis M, Aghaways I, Masood J, Buchholz N. Laparoscopic varicocelectomy in the management of chronic scrotal pain. *JLS*. 2014 Jul-Sep;18(3). pii: e2014.00302. doi: 10.4293/JLS.2014.00302. PubMed PMID: 25392634; PubMed Central PMCID: PMC4154424
- 4: Bourdounis A, Miernik A, Hawizy A, Kachrilas S, El Howairis M, Schoenthaler M, Masood J, Buchholz N. A comprehensive update on urinary tract lithiasis management. *Panminerva Med*. 2014 Mar;56(1):1-15. Review. PubMed PMID: 24637469.
- 5: Papadopoulos G, Bourdounis A, Kachrilas S, Bach C, Buchholz N, Masood J. Hyoscine N-butylbromide (Buscopan®) in the treatment of acute ureteral colic: what is the evidence? *Urol Int*. 2014;92(3):253-7. doi: 10.1159/000358015. Epub 2014 Feb 26. Review. PubMed PMID: 24576895
- 6: Christodoulou M, Kachrilas S, Dina A, Bourdounis A, Masood J, Buchholz N, Papatsoris A. How to conduct a successful workshop: The trainees' perspective. *Arab J Urol*. 2014 Mar;12(1):12-4. doi: 10.1016/j.aju.2013.08.004. Epub 2013 Sep 12. PubMed PMID: 26019914; PubMed Central PMCID: PMC4434501.
- 7: Bourdounis A, Stasinou T, Kachrilas S, Papatsoris AG, Buchholz N, Masood J. Thromboprophylaxis and bleeding diathesis in minimally invasive stone surgery. *Nat Rev Urol*. 2014 Jan;11(1):51-8. doi: 10.1038/nrurol.2013.278. Epub 2013 Dec 17. Review. PubMed PMID: 24346006.
- 8: Kachrilas S, Bourdounis A, Karaolides T, Nikitopoulou S, Papadopoulos G, Buchholz N, Masood J. Current status of minimally invasive endoscopic management of ureteric strictures. *Ther Adv Urol*. 2013 Dec;5(6):354-65. doi: 10.1177/1756287213505671. Review. PubMed PMID: 24294293; PubMed Central PMCID: PMC3825111.
- 9: Bourdounis A, Tanabalan C, Goyal A, Kachrilas S, Buchholz N, Masood J. The difficult ureter: stent and come back or balloon dilate and proceed with ureteroscopy? What does the evidence say? *Urology*. 2014 Jan;83(1):1-3. doi: 10.1016/j.urology.2013.08.073. Epub 2013 Nov 11. PubMed PMID: 24231206.
- 10: Bach C, Kabir MN, Goyal A, Malliwal R, Kachrilas S, El Howairis ME, Masood J, Buchholz N, Junaid I. A self-expanding thermolabile nitinol stent as a minimally invasive treatment alternative for ureteral strictures in renal transplant patients. *J Endourol*. 2013 Dec;27(12):1543-5. doi: 10.1089/end.2013.0180. Epub 2013 Nov 14. PubMed PMID: 24229429.
- 11: Christopoulos P, Fryad G, Bourdounis A, Papadopoulos G, Kachrilas S, Masood J, Buchholz N. Panlithiasis of the urinary tract: a case for open lithotomy in the modern era. *Urolithiasis*. 2014 Apr;42(2):177-80. doi: 10.1007/s00240-013-0617-0. Epub 2013 Nov 8. PubMed PMID: 24202299.
- 12: Bourdounis A, Kachrilas S, Kapoor S, Zaman F, Papadopoulos G, Buchholz N, Masood J. The use of a thermoexpandable metal alloy stent in the minimally invasive management of retroperitoneal fibrosis: a single center experience from the United kingdom. *J Endourol*. 2014 Jan;28(1):96-9. doi: 10.1089/end.2013.0332. Epub 2013 Nov 14. PubMed PMID: 23914726.
- 13: Panah A, Patel S, Bourdounis A, Kachrilas S, Buchholz N, Masood J. Factors predicting success of emergency extracorporeal shockwave lithotripsy (eESWL) in ureteric calculi--a single centre experience from the United Kingdom (UK).

Urolithiasis. 2013 Oct;41(5):437-41. doi: 10.1007/s00240-013-0580-9. Epub 2013 Jun 9. PubMed PMID: 23748923.

14: Kachrilas S, Papatsoris A, Bach C, Bourdounis A, Zaman F, Masood J, Buchholz N. The current role of percutaneous chemolysis in the management of urolithiasis: review and results. *Urolithiasis*. 2013 Aug;41(4):323-6. doi:10.1007/s00240-013-0575-6. Epub 2013 Jun 7. Review. PubMed PMID: 23743991.

15: Karaolides T, Bach C, Kachrilas S, Goyal A, Masood J, Buchholz N. Improving the durability of digital flexible ureteroscopes. *Urology*. 2013 Apr;81(4):717-22. doi: 10.1016/j.urology.2013.01.016. Epub 2013 Mar 7. PubMed PMID: 23465156.

16: Bach C, Goyal A, Kumar P, Kachrilas S, Papatsoris AG, Buchholz N, Masood J. The Barts 'flank-free' modified supine position for percutaneous nephrolithotomy. *Urol Int*. 2012;89(3):365-8. doi: 10.1159/000341430. Epub 2012 Oct 5. PubMed PMID: 23052010.

17: Bach C, Nesar S, Kumar P, Goyal A, Kachrilas S, Papatsoris A, Masood J, Buchholz N. The new digital flexible ureteroscopes: 'size does matter'--increased ureteric access sheath use! *Urol Int*. 2012;89(4):408-11. doi: 10.1159/000341429. Epub 2012 Sep 4. PubMed PMID: 22964494.

18: Kumar P, Bach C, Kachrilas S, Papatsoris AG, Buchholz N, Masood J. Supine percutaneous nephrolithotomy (PCNL): 'in vogue' but in which position? *BJU Int*. 2012 Dec;110(11 Pt C):E1018-21. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11188.x. Epub 2012 May 7. Review. PubMed PMID: 22564784.

19: Kachrilas S, Papatsoris A, Bach C, Kontos S, Faruquz Z, Goyal A, Masood J, Buchholz N. Colon perforation during percutaneous renal surgery: a 10-year experience in a single endourology centre. *Urol Res*. 2012 Jun;40(3):263-8. doi: 10.1007/s00240-012-0464-4. Epub 2012 Feb 4. Erratum in: *Urol Res*. 2012 Jun;40(3):269. Stefanos, Kachrilas [corrected to Kachrilas, Stefanos]; Athanasios, Papatsoris [corrected to Papatsoris, Athanasios]; Christian, Bach [corrected to Bach, Christian]; Stylianos, Kontos [corrected to Kontos, Stylianos]; Zaman, Faruquz [corrected to Faruquz, Zaman]; Anuj, Goyal [corrected to Goyal, Anuj]; Junaid, Masood [corrected to Masood, Junaid]; Noor, Buchholz [corrected to Buchholz, Noor]. PubMed PMID: 22307366.

20: Bach C, Zaman F, Kachrilas S, Kumar P, Buchholz N, Masood J. Drugs for pain management in shock wave lithotripsy. *Pain Res Treat*. 2011;2011:259426. doi: 10.1155/2011/259426. Epub 2011 Nov 3. PubMed PMID: 22135735; PubMed Central PMCID: PMC3216367.

21: Kabir MN, Bach C, Kachrilas S, Zaman F, Junaid I, Buchholz N, Masood J. Use of a long-term metal stent in complex uretero-ileal anastomotic stricture. *Arab J Urol*. 2011 Dec;9(4):251-3. doi: 10.1016/j.aju.2011.08.002. Epub 2011 Sep 15. PubMed PMID: 26579307; PubMed Central PMCID: PMC4150572.

22: Bach C, Kabir M, Zaman F, Kachrilas S, Masood J, Junaid I, Buchholz N. Endourological management of ureteric strictures after kidney transplantation: Stenting the stent. *Arab J Urol*. 2011 Sep;9(3):165-9. doi: 10.1016/j.aju.2011.08.001. Epub 2011 Nov 23. Review. PubMed PMID: 26579290; PubMed Central PMCID: PMC4150573.

23: Kontos S, Papatsoris A, Kominea A, Melachrinou M, Tanoglidi A, Kachrilas S, Karavitakis M, Balampani E, Sotiropoulou-Bonikou G. Expression of ER β and its co-regulators p300 and NCoR in human transitional cell bladder cancer. *Urol Int*. 2011;87(2):151-8. doi: 10.1159/000324262. Epub 2011 Apr 22. PubMed PMID: 21525722.

24: Papatsoris AG, Kachrilas S, Howairis ME, Masood J, Buchholz N. Novel technologies in flexible ureterorenoscopy. *Arab J Urol*. 2011 Mar;9(1):41-6. doi: 10.1016/j.aju.2011.03.011. Epub 2011 May 6. Review. PubMed PMID: 26579266; PubMed

Central PMCID: PMC4372220.

25: Papatsoris AG, Junaid I, Zachou A, Kachrilas S, Zaman F, Masood J, Buchholz N. New developments in the use of prostatic stents. *Open Access J Urol*. 2011 Apr 28;3:63-8. doi: 10.2147/OAJU.S11752. Review. PubMed PMID: 24198637; PubMed Central PMCID: PMC3818938.

26: Kontos S, Doumanis G, Karagianni M, Politis V, Simaioforidis V, Kachrilas S, Koritsiadis S. Burned-out testicular tumor with retroperitoneal lymph node metastasis: a case report. *J Med Case Rep*. 2009 Jul 31;3:8705. doi: 10.4076/1752-1947-3-8705. PubMed PMID: 19830238; PubMed Central PMCID: PMC2737757.

27: Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG, Melachroinou S, Lampidonis AD, Anastasiou D, Kachrilas S, Messini-Nikolaki N, Papassideri IS, Aravantinos G, Margaritis LH, Voutsinas GE. Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2009 Jan;34(1):137-60. PubMed PMID: 19082486.

28: Kontos S, Politis V, Fokitis I, Lefakis G, Koritsiadis G, Simaioforidis V, Kachrilas S, Chatzplis E, Koritsiadis S. Rapture of renal angiomyolipoma during pregnancy: a case report. *Cases J*. 2008 Oct 17;1(1):245. doi: 10.1186/1757-1626-1-245. PubMed PMID: 18928528; PubMed Central PMCID: PMC2576180.

29: Papatsoris AG, Kachrilas S, Gekas A. Where are we with the treatment of metastatic bladder cancer? *Expert Opin Investig Drugs*. 2007 Sep;16(9):1311-4.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Η ΟΥΡΟΔΟΧΟΣ ΚΥΣΤΗ

1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
2. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
3. Η ΣΤΗΡΙΞΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΕΡΙΒΛΗΤΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
5. ΑΓΓΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

B. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ
2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ
4. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ-ΒΑΘΜΟΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ
5. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΡΥΘΜΟ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ
6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
7. ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΟΥ
8. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
9. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
10. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
11. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΥ Ca ΚΥΣΤΕΩΣ
12. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ
13. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ
14. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ
15. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
16. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ
17. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΡΙΖΚ/ΑΚΤ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΙΣΤΟ
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ
3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)
4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ
5. ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ DNA
6. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ PCR ΠΡΟΙΩΝΤΩΝ (100bp-10kb) ΤΗΣ QiAquickkitΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΥ
7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA
8. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ
9. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ
10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ
11. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΡΙΖΚΑ
2. mRNA ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ – ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ mRNA ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
5. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ
6. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ PTEN
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ PAKT ΜΕ ΤΟ PTEN
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ MRNA ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ P85, P110 ΚΑΙ PTEN ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ PAKT ΚΑΙ PTEN
10. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΜΙΚΤΗ Η ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ PTEN ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΩΣ ΥΨΗΛΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ PAKT ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

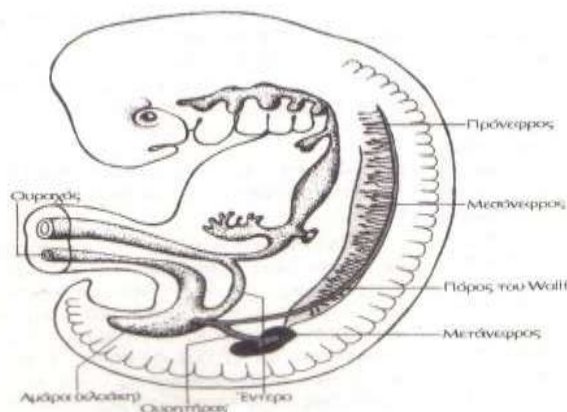
A. Η ΟΥΡΟΔΟΧΟΣ ΚΥΣΤΗ

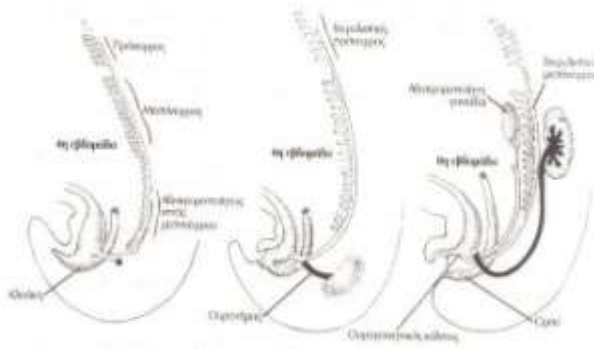
1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Κατά την κάμψη του εμβρύου, ο αλλαντοειδής πόρος ο οποίος αποτελεί προεκβολή του οπισθίου τοιχώματος του λεκιθικού ασκού, περικλείεται μέσα στον κοιλιακό μίσχο και εκβάλλει στην πρόσθια επιφάνεια του οπισθίου εντέρου. Κατά την τέταρτη εβδομάδα της διαπλάσεως, από το σημείο της εκβολής του αλλαντοειδούς πόρου αρχίζει να σχηματίζεται ένα κατά μέτωπο διάφραγμα, το αμαρικό διάφραγμα (Εικ.1). Το διάφραγμα αυτό αναπτυσσόμενο προοδευτικά μεταξύ της τέταρτης και της έβδομης εβδομάδας, προχωρεί προς τον αμαρικό υμένα και διαιρεί το οπίσθιο έντερο σε μία πρόσθια (κοιλιακή) και σε μια οπίσθια (ραχιαία) μοίρα. Η πρόσθια μοίρα αποτελεί την καταβολή της ουροδόχου κύστεως, της ουρήθρας και, στα θήλαα έμβρυα, του προδρόμου του κολεού. Διαιρείται σε μια κυστεοουρηθρική μοίρα, που βρίσκεται πάνω από την εκβολή των πόρων του Wolf και στον ουρογεννητικό κόλπο που βρίσκεται κάτω από την εκβολή των πόρων αυτών. Η οπίσθια μοίρα του οπισθίου εντέρου ονομάζεται ευθυπρωκτικός σωλήνας και αποτελεί την καταβολή του απευθυσμένου.

Όταν το ουροευθυϊκό διάφραγμα φθάσει στον αμαρικό υμένα Εικ.2 , συμφύεται με αυτόν και τον διαιρεί σε μία πρόσθια μοίρα τον ουρογεννητικό υμένα και σε μία οπίσθια, τον πρωκτικό υμένα. Ο ούρογεννητικός υμένας αποφράσσει τον ουρογεννητικό κόλπο και ρηγνύετε κατά την 6^η εβδομάδα της διαπλάσεως,. Από την κυστεοουρηθρική μοίρα της πρόσθιας (κοιλιακής) μοίρας του οπισθίου εντέρου, που βρίσκεται πάνω από την εκβολή των πόρων του Wolf σχηματίζεται η ουροδόχος κύστη και ένα πολύ μικρό μέρος της ουρήθρας Η σχηματιζόμενη έτσι ουροδόχος κύστη, στην αρχή της διαπλάσεώς της, επικοινωνεί με τον αλλαντοειδή πόρο ο οποίος εκβάλλει στο σημείο αυτό. Αργότερα, όταν ο αλλαντοειδής πόρος ατροφήσει, αντικαθίσταται από συνδετικό ιστό που σχηματίζει τον ουραχό. Αυτός συνδέει την κορυφή της ουροδόχου κύστεως με τον ομφάλιο λώρο. Στον ενήλικα, υπόλειμμα του ουραχού αποτελεί τον μέσο ομφαλοκυστικό σύνδεσμο.

Κατά τη διάρκεια της διαπλάσεώς της ουροδόχου κύστεως, τα κάτω (ουραία) άκρα των πόρων του Wolf εκβάλλουν το οπίσθιο τοίχωμα της. Στο σημείο αυτό, τα ουραία άκρα των πόρων του Wolf διευρύνονται και συμβάλλουν στον σχηματισμό της ουροδόχου κύστεως. Η θέση της εκβολής τους αποτελεί το ονομαζόμενο κυστικό τρίγωνο. Το επιθήλιο του βλενογόνου της ουροδόχου κύστεως στη θέση του κυστικού τριγώνου είναι μεσοδερμικής προελεύσεως, επειδή προέρχεται από τους πόρους του Wolf. Στην υπόλοιπη έκταση της ουροδόχου κύστεως είναι ενδοδερμικής προελεύσεως επειδή προέρχεται από το οπίσθιο έντερο (Σομπότα, 2013).





Εικ.1 και 2.Σχηματική αναπαράσταση της διάπλασης των νεφρών και του κατώτερου ουροποιητικού.

Η ουροδόχος κύστη είναι ένα μονοφυές, κοίλο, μυώδες όργανο, το οποίο χρησιμεύει αφενός στη συγκέντρωση του ούρου που φτάνει κατά κύματα από τους ουρητήρες και αφετέρου, με την προαιρετική σύσπαση του, στην εξώθηση του ούρου δια της ουρήθρας εκτός του σώματος.

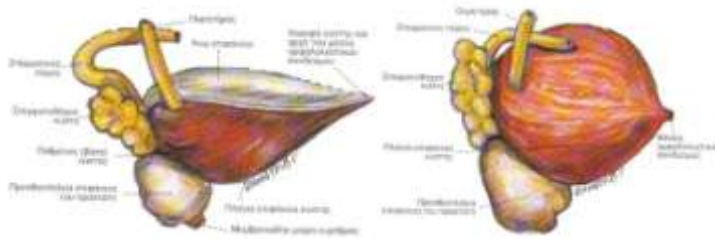
Θέση: Η ουροδόχος κύστη βρίσκεται στην ελάσσινα πύελο, στον εξωπεριτοναϊκό χώρο, ανάμεσα στην ηβική σύμφυση (μπροστά) και το ορθό ή τη μήτρα (πίσω).Εικ.3



Εικ.3.Σχηματική απεικόνιση μιας οβελιαίας τομής σε κενή ουροδόχο κύστη γυναίκας.

ηλικία, το φύλο, την ψυχική διάθεση και τις συνήθειες (διαστήματα κένωσης της κύστης) του ατόμου. Κατά μέσο όρο, στους ενήλικους άνδρες, όταν η ουροδόχος κύστη συγκεντρώσει ποσότητα ούρων μεταξύ 150-300 κυβικών εκ. προξενείται η αίσθηση της πληρότητας της κύστης η οποία μετατρέπεται σε αίσθηση ανάγκης προς ούρηση. Η τελευταία είναι δυνατό να αναβληθεί με τη θέληση του ατόμου και είναι ανεκτή ώστε να γίνεται δυνατή η συγκέντρωση έως και 600 κυβικών εκατοστών ούρων .

Μορφή και σχέσεις: Η μορφή της ουροδόχου κύστης επηρεάζεται από την ηλικία του ατόμου, τον βαθμό πληρότητας της, το μέγεθος της, τη θέση των γεννητικών οργάνων (μήτρας και ωθηκών) καθώς και τη θέση του σώματος. Η πτωματική ουροδόχος κύστη που έχει γεμίσει με υγρό σχήμα ωοειδές ή ατρακτοειδές, αποπλατυσμένο εκ των πρόσω προς τα πίσω, ώστε να εμφανίζει δύο επιφάνειες (πρόσθια και οπίσθια) και δύο πλάγια χείλη (αριστερό και δεξιό).Εικ.4.



Εικ.4. Σχηματική απεικόνιση ουροδόχου κύστης με μικρή ποσότητα ούρων και με αυξημένη ποσότητα ούρων.

Διακρίνεται η κορυφή, το σώμα και ο πυθμένας της κύστης. Η κορυφή φέρεται προς τα άνω και πρόσω χωρίς να υπάρχει συγκεκριμένο όριο μεταξύ αυτής και του σώματος·

Ο πυθμένας -η βάση έχει τριγωνικό σχήμα και στρέφεται προς τα εμπρός και κάτω. Η πρόσθια κάτω γωνία του πυθμένα διαμορφώνει τον αυχένα της κύστης, ενώ αντίστοιχα προς τις άνω έξω γωνίες του εισέρχονται στην κύστη οι ουρητήρες.

Ο αυχέννας της ουροδόχου κύστης χρησιμοποιείται περισσότερο στην εγχειρητική του ουροποιητικού συστήματος και χαρακτηρίζει το κατώτερο και περισσότερο σταθερό τμήμα της βάσης της κύστης, μέσω του οποίου διέρχεται η ουρήθρα. Ο αυχέννας της κύστης έρχεται σε σχέση στους άνδρες με τη βάση του προστάτη και στις γυναίκες με την πυελική περιτονία που περιβάλλει την ουρήθρα.

Η άνω (οπίσθια) επιφάνεια Εικ.5 οριοθετείται από τις δύο πλάγιες επιφάνειες με τα πλάγια χείλη, τα οποία εκτείνονται από την πρόσφυση του μέσου ομφαλοκυστικού συνδέσμου (κορυφή) έως τα σημεία εισόδου των ουρητήρων, και από τον πυθμένα με το οπίσθιο χείλος. Στους άνδρες καλύπτεται εξολοκλήρου από το περιτόναιο και βρίσκεται σε επαφή με τις τελικές έλικες του ειλεού και το σιγμοειδές κόλο. Η άνω επιφάνεια της ουροδόχου κύστης στις γυναίκες έρχεται σχέση με τη μήτρα.



Εικ.5.Σχηματική απεικόνιση της ουροδόχου κύστης ανδρός ,όπου διακρίνεται μέρος της βάσης και της άνω επιφάνειας της κύστης.

Οι πλάγιες επιφάνειες δεν καλύπτονται από περιτόναιο και στρέφονται προς τα κάτω, εμπρός και έξω. Στους άνδρες έρχονται σε σχέση προς τα πρόσω με την ηβική σύμφυση και τους ηβοπροστατικούς συνδέσμους και από τις ανατομικές αυτές δομές χωρίζονται με την παρεμβολή χαλαρού λιπώδη συνδετικού ιστού, μέσα στον οποίο βρίσκονται κλάδοι του αιδοϊκού φλεβώδους πλέγματος (Gartner and Hiatt, 2011).

3. Η ΣΤΗΡΙΞΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΕΡΙΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Το κύριο στήριγμα της ουροδόχου κύστης, άμεσα στις γυναίκες ή έμμεσα (με την παρεμβολή του προστάτη) στους άνδρες, είναι το πυελικό έδαφος (περίναιο)· στις γυναίκες συμμετέχει και το ανώτερο τμήμα του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος. Είναι οι δύο οπίσθιοι ηβοουρηθρικοί σύνδεσμοι, ο μέσος ηβοουρηθρικός και ο πρόσθιος ηβοουρηθρικός σύνδεσμος, καθώς και το υπερκολεϊκό διάφραγμα και οι κυστεομητρικοί σύνδεσμοι στις γυναίκες. Επιπλέον, συμβάλλουν στη στήριξη της ουροδόχου κύστης οι ηβοκυστικοί και οι ομφαλοκυστικοί σύνδεσμοι, καθώς και τα περιβλήματα της όπως το περιτόναιο, η προκυστική περιτονία, το περικύστιο και βέβαια τα αγγεία της.

α) Οι ηβοκυστικοί σύνδεσμοι είναι ινομυώδεις δεσμίδες που εκτείνονται από την οπίσθια επιφάνεια της ηβικής σύμφυσης έως τον αυχένα της ουροδόχου κύστης. Αποτελούν κατά κάποιο τρόπο παχύνσεις της ενδοπελκικής περιτονίας (περιτονία του ανελκτήρα του πρωκτού) και περιγράφονται δύο πλάγιοι ηβοκυστικοί (στις γυναίκες) ή ηβοπροστατικοί (στους άνδρες) σύνδεσμοι.

β) Οι ομφαλοκυστικοί σύνδεσμοι είναι τρεις και διακρίνονται στον μέσο και στους δύο πλάγιους. Ο μέσος ομφαλοκυστικός σύνδεσμος αρχίζει από την κορυφή της ουροδόχου κύστης, όπου διαμορφώνει μία κωνοειδή βάση και εκτείνεται κατά μήκος της λευκής γραμμής, εξωπεριτοναϊκά, έως το κάτω χείλος του ομφαλικού δακτυλίου, όπου και προσφύεται.

γ) Το περιτόναιο της οπίσθιας επιφάνειας του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος, αντίστοιχα προς την κορυφή της ουροδόχου κύστης, φέρεται στην άνω επιφάνεια της, την οποία και καλύπτει. Από το ύψος μιας εγκάρσιας γραμμής που ενώνει τις εκβολές των ουρητήρων το περιτόναιο ανακάμπτει και σχηματίζει το ευθυκυστικό (στους άνδρες) ή το κυστεομητρικό (στις γυναίκες) κόλπωμα, και στη συνέχεια διαμορφώνει τον ορογόνο υμένα του ορθού ή της μήτρας αντίστοιχα.

Από την πορεία αυτή του περιτοναίου προκύπτει ότι η ουροδόχος κύστη ανήκει στα εξωπεριτοναϊκά όργανα.

δ) Η προκυστική περιτονία είναι ένα τριγωνικού σχήματος πέταλο από συμπαγή ινώδη συνδετικό ιστό, που φέρεται κατά μέτωπο και περιβάλλει από εμπρός και πλάγια την ουροδόχο κύστη. Προς τα πρόσω της προκυστικής περιτονίας και ανάμεσα σ' αυτήν και το πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα σχηματίζεται ένα σχισμοειδές διάστημα που λέγεται προκυστικός χώρος (του Retzius), που υποδέχεται την ουροδόχο κύστη όταν γεμίζει από ούρα. Εικ.3.

4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης έχει πάχος 1,5-2εκ. και συνίσταται από δύο κυρίως χιτώνες, τον μυϊκό και τον βλεννογόνο. Επί τα εκτός του μυϊκού χιτώνα περιβάλλεται η κύστη από τα περιβλήματα της, ενώ μεταξύ του μυϊκού χιτώνα και του επιθηλίου του βλεννογόνου παρεμβάλλεται στιβάδα συνδετικού ιστού. Ο μυϊκός χιτώνας συνίσταται από πολυάριθμες δέσμες μυϊκών ινών, που φέρονται έτσι ώστε να διευθετούνται σε τρεις στιβάδες, την έξω, τη μέση και την έσω Εικ.6..

Εικ.6.. Σχηματική απεικόνιση των στιβάδων του εξωστήρα μύος της κύστης Έξω ή επιπολής στιβάδα Μέση ή κυκλοτερής στιβάδα Γ. Εν τω βάθει ή έσω στιβάδα



Οι στιβάδες αυτές διαχωρίζονται ατελώς η μία από την άλλη, επειδή δέσμες από μυϊκές ίνες της μιας συνεχίζονται στην άλλη. Έτσι όλος ο μυϊκός χιτώνας της ουροδόχου κύστης θεωρείται λειτουργικά ένα σύνολο που λέγεται εξωστήρας μύς της κύστης.

1. Ο εξωστήρας μύς της κύστης συνίσταται από δέσμες λείων μυϊκών ινών που διατίθενται σε τρεις στιβάδες, την έξω, τη μέση και την έσω.

α) Η έξω ή επιμήκης μυϊκή στιβάδα αποτελείται από δέσμες μυϊκών ινών που φέρονται επιμήκως· είναι περισσότερο αναπτυγμένες και σχηματίζουν ένα ενιαίο μυϊκό πέταλο κοντά στη μέση γραμμή, στην άνω και στις πλάγιες επιφάνειες της κύστης. Οι μυϊκές ίνες του έξω χιτώνα που φέρονται στην ουρήθρα συνεχίζουν με κυκλοτερή ή

σπειροειδή φορά να πορεύονται στον μυϊκό χιτώνα της τελευταίας, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση του σφιγκτηριακού μηχανισμού του έσω στομίου της.

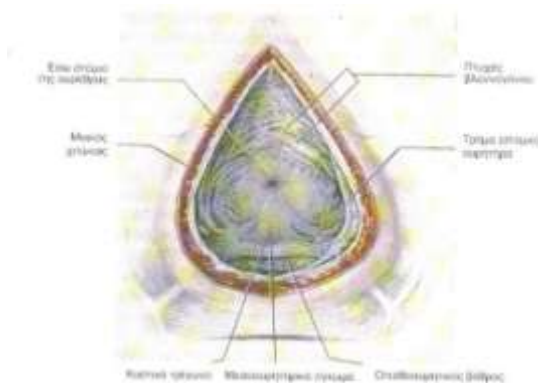
β) Η μέση ή κυκλοτερής μυϊκή στιβάδα είναι εξαιρετικά λεπτή και σχηματίζει ένα συνεχές και ενιαίο στρώμα που εκτείνεται σε όλη την ουροδόχο κύστη είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένη στην περιοχή του αυχένα, όπου οι μυϊκές ίνες της φέρονται κυκλοτερώς συμμετέχοντας στη διαμόρφωση του έσω σφιγκτήρα της κύστης, ενώ δεν επεκτείνονται στο υπόλοιπο μυϊκό τοίχωμα της ουρήθρας

γ) Η έσω μυϊκή στιβάδα συνίσταται από αραιές δέσμες μυϊκών ινών, που άλλες αποτελούν τη συνέχεια των μυϊκών ινών της μέσης στιβάδας και άλλες των μυϊκών ινών του κυστικού τριγώνου. Οι μυϊκές δέσμες διευθετούνται έτσι ώστε να σχηματίζουν πλέγματα, ενώ οι περισσότερες έχουν επιμήκη κατεύθυνση.

2. Ο μυϊκός χιτώνας στην περιοχή του κυστικού τριγώνου συνίσταται από δύο μυϊκές στιβάδες, την επιπολής και την εν τω βαθει. Οι μυϊκές ίνες του επιπολής τριγώνου μύος είναι η συνέχεια του εξωστήρα μύος της κύστης.

3. Ο μυϊκός χιτώνας στην περιοχή του αυχένα της κύστης συνίσταται από λείες μυϊκές ίνες που διαφέρουν από αυτές του εξωστήρα μύος. Στους άνδρες, οι μυϊκές ίνες του αυχένα φέρονται προς την ουρήθρα, την οποία και περιβάλλουν κυκλικά. Οι μυϊκές αυτές ίνες χαρακτηρίζονται ως έσω σφιγκτήρας της ουρήθρας

Ο βλεννογόνος της κύστης Εικ.7 είναι παχύς (πάχος 0,5εκ.) και αποτελεί τη συνέχεια του βλεννογόνου των ουρητήρων και της ουρήθρας όπως ο βλεννογόνος των ουρητήρων έτσι και αυτός αποτελείται από επιθήλιο και χόριο. Το επιθήλιο του βλεννογόνου χαρακτηρίζεται ως μεταβατικό ή ουροθήλιο και συνίσταται από άφθονα κύτταρα, συνδεδεμένα στερεά, ώστε να μην επιτρέπουν τη διήθηση του ούρου ή άλλων ουσιών στους υποκείμενους ιστούς. Το χόριο συνίσταται από συνδετικό ιστό πλούσιο σε κολλαγόνες και ελαστικές ίνες. Μεταξύ του μυϊκού χιτώνα και του ουροθηλίου παρεμβάλλεται άφθονος συνδετικός ιστός, ιδιαίτερα παχύς στην περιοχή του πυθμένα. Τα κύτταρα του επιθηλίου έχουν δυνατότητα παραγωγής βλενώδους ουσίας (ουροβλεννοειδές) που καλύπτει όλο το ουροθήλιο και δρα προστατευτικά απέναντι στα ούρα. Η όψη του βλεννογόνου που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια της ουροδόχου κύστης, όταν αυτή είναι κενή, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών και παχιών πτυχών, οι οποίες λεπταίνουν ή εξαλείφονται όταν η κύστη γεμίσει (Gartnet and Hiatt, 2013, Ahmad et.al, 2015).



Εικ.7. Η εσωτερική επιφάνεια της ουροδόχου κύστης που είναι κενή από ούρα και βρίσκεται σε σύσπαση. Όψη από άνω και πίσω μετά από διατομή και αφαίρεση του άνω οπισθίου τοιχώματος της .

Η αιμάτωση της ουροδόχου κύστης διενεργείται από το περικυστικό αρτηριακό δίκτυο που την περιβάλλει και το οποίο διαμορφώνεται από κλάδους κυρίως της άνω και

της κάτω κυστικής αρτηρίας, που είναι κλάδοι του πρόσθιου στελέχους της έσω λαγόνιας αρτηρίας (Gartnet and Hiatt, 2013, Birder, 2013).

Η άνω κυστική αρτηρία κατανέμεται κυρίως στο πρόσθιο και άνω μέρος της κύστης και η κάτω κυστική, που στις γυναίκες αντικαθίσταται από κλάδους της κολεικής αρτηρίας, στο οπίσθιο κάτω μέρος της. Συμμετέχουν όμως στη διαμόρφωση του περικυστικού αρτηριακού δικτύου και κλαδίσκοι από την έσω αιδοϊκή, τη θυροειδή, τη μητριάια καθώς και από την κάτω γλουτιαία αρτηρία, οι οποίοι από ορισμένους χαρακτηρίζονται ως πρόσθιες κυστικές αρτηρίες.

Οι φλέβες αρχίζουν από το κυστικό (περικυστικό) φλεβώδες πλέγμα (του Santorini), το οποίο είναι ιδιαίτερα πυκνό στην περιοχή της βάσης και του αυχένα της κύστης (κυστεοπροστατικό φλεβώδες πλέγμα). Από το φλεβώδες αυτό πλέγμα σχηματίζονται στις πλάγιες επιφάνειες της κύστης 4 ή 5 μεγάλες φλέβες, οι οποίες εκβάλλουν στις έσω λαγόνιες φλέβες.

Τα λεμφοαγγεία που αποχετεύουν τη λέμφο της ουροδόχου κύστης συνοδεύουν τις φλέβες της και εκβάλλουν στα λαγόνια λεμφοαγγεία, αφού προηγουμένως διέλθουν από τα κυστικά λεμφοαγγεία. Η λέμφος από το ανώτερο μέρος της κύστης κατευθύνεται προς τα έξω λαγόνια λεμφοαγγεία και αυτή από το κατώτερο μέρος της προς τα έσω λαγόνια, ενώ από την περιοχή του αυχένα κατευθύνεται προς τα ιερά ή τα κοινά λαγόνια.

Τα νεύρα της κύστης είναι τα άνω και κάτω κυστικά νεύρα, που συνοδεύουν τους κλάδους των ομώνυμων αρτηριών και αποτελούν κλάδους του κυστικού πλέγματος. Το κυστικό φυτικό πλέγμα βρίσκεται στα πλάγια του πυθμένα της ουροδόχου κύστης, όπου περιβάλλει την κατώτερη μοίρα των ουρητήρων. Σχηματίζεται ως επέκταση του υπογαστρίου φυτικού νευρικού πλέγματος και περιέχει συμπαθητικές ίνες (μεταγαγγλιακές), από το Θ_{10} έως το Θ_2 νευροτόμιο και παρασυμπαθητικές ίνες (προγαγγλιακές), κλάδους των πυελικών σπλαχνικών νύρων (I_2 , I_3 και I_4 νευροτόμιο). Τόσο το συμπαθητικό όσο και το παρασυμπαθητικό σύστημα περιλαμβάνουν φυγόκεντρες και κεντρομόλες ίνες. Οι φυγόκεντρες ίνες του συμπαθητικού συστήματος προκαλούν χάλαση του εξωστήρα μυός της κύστης και σύσπαση του έσω σφιγκτήρα της ουρήθρας, ενώ του παρασυμπαθητικού (κυρίως από I_3 νευροτόμιο) προκαλούν σύσπαση του εξωστήρα μυός και χάλαση του έσω σφιγκτήρα (επιπολής τρίγωνος μυς)(Gartnet and Hiatt, 2013, Birder, 2013).

B. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

1. Επιδημιολογία – Σταδιοποίηση

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αντιπροσωπεύει την ενάτη συνηθέστερη αιτία καρκίνου στην παγκόσμια κοινότητα κατά το 2000, με τον καρκίνο του πνεύμονα να διατηρεί την πρώτη θέση μεταξύ των κακοηθειών. Υπολογίζεται ότι 336000 νέες περιπτώσεις καρκίνου της ουροδόχου κύστεως το χρόνο εμφανίζονται παγκοσμίως, αντιπροσωπεύοντας το 3,3% των νέων περιπτώσεων καρκίνου ανά έτος. Από τις περιπτώσεις αυτές 260000 αφορούν τους άνδρες και οι υπόλοιπες 76000 τις γυναίκες (Jordan and Iyre, 2015). Η αναλογία εμφάνισης επομένως μεταξύ ανδρών/γυναϊκών είναι 3,4/1. Επιπλέον ο αριθμός των ασθενών που θα πεθάνουν από καρκίνο της ουροδόχου κύστεως υπολογίζεται σε 132000 ετησίως παγκοσμίως αποτελώντας το 2,1% των θανόντων από καρκίνο. Η θνητότητα είναι 6,55 για τους άνδρες και 1,21 για τις γυναίκες, δηλαδή πενταπλάσια για τους άνδρες.

Η Ελλάδα κατέχει υψηλή θέση μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης με 16 νέες περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού ανά έτος σύμφωνα με τα στοιχεία από το EAUCAN (European Union CANcer incidence, mortality and prevalence). Η αναλογία στη χώρα μας μεταξύ ανδρών / γυναικών είναι της τάξης του 4,6/1, ενώ η

νόσος συναντάται σε μεγαλύτερη συχνότητα στους κατοίκους των αστικών περιοχών. Επιπλέον η θνησιμότητα από καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχει διπλασιαστεί στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών. WHO cancer databank (WHO, 2015)

Επιδημιολογία

Το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως είναι το δεύτερο σε συχνότητα καρκίνωμα του ουρογεννητικού στον άνθρωπο, μετά από αυτό του προστάτη (Sonpavde et.al, 2015). Στον άνδρα αποτελεί τον 4^ο κατά σειρά καρκίνο, μετά από αυτούς του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, ενώ στη γυναίκα τον 8^ο (Sonpavde et.al, 2015). Υπάρχει μία σαφής υπεροχή των ανδρών μεταξύ των πασχόντων, με την αναλογία ανδρών προς γυναίκες να είναι 3/1. Το 1995 εμφανίσθηκαν περίπου 50.000 νέες περιπτώσεις Ca κύστεως στις ΗΠΑ, η δε συχνότητα της νόσου εμφανίζει μια σαφή αυξητική τάση, με μια αύξηση περίπου 50 % απ' το 1950 (Jani et.al, 2015). Μεταξύ των ετών 1984-1993 οι ετήσια διαγιγνώσκόμενες περιπτώσεις καρκίνου της ουροδόχου κύστεως στις ΗΠΑ αυξήθηκαν κατά 36 % περίπου και η αύξηση αυτή αφορούσε κυρίως άνδρες.

Το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως είναι περίπου διπλάσιο σε συχνότητα στους λευκούς απ' ότι στους μαύρους άνδρες (Sonpavde et.al, 2015). Υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτή η διαφορά συχνότητας περιορίζεται στα επιφανειακά καρκινώματα και όχι στα διηθητικά.

Θνησιμότητα - Θνητότητα

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως ευθύνεται για το 2,6 % όλων των θανάτων από καρκίνο στους άνδρες και το 1,4 % στις γυναίκες, με τους άνδρες όμως να έχουν υψηλότερη 5ετή επιβίωση. Μεταξύ των δύο φύλων η μικρότερη 5ετής επιβίωση παρατηρείται στις μαύρες γυναίκες (περίπου 51 %), ενώ η υψηλότερη στους λευκούς άνδρες (περίπου 86 %) (8). Είναι πιθανό ότι η διαφορά αυτή οφείλεται στο χαμηλότερο ποσοστό μαύρων ασθενών με εντοπισμένη νόσο τη στιγμή της διάγνωση (Malats and Real, 2015). Πιθανόν όμως να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες όπως η καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, η πιο συχνή εμφάνιση επιθετικότερων μορφών (όπως μη TCC καρκινωμάτων), ακόμη και η μη αποδοχή της ιδανικότερης, κατά περίπτωση, μορφής θεραπείας από τους μαύρους ασθενείς.

Από το 1950 μέχρι σήμερα παρατηρήθηκε μείωση στη θνητότητα της νόσου περίπου κατά 33 % και αυτή αφορούσε κυρίως τους άνδρες. Θεωρείται ότι η θνητότητα των γυναικών είναι δυσανάλογα μεγάλη, ιδίως όταν συγκριθεί με τις λοιπές παραμέτρους της νόσου (Jani et.al, 2015).

Ηλικία

Αν και το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως μπορεί να εμφανισθεί σε οποιαδήποτε ηλικία (ακόμη και σε παιδιά), συνήθως αποτελεί νόσο της μέσης και μεγάλης ηλικίας, αφού η μέση ηλικία εμφάνισής του είναι τα 69 έτη στους άνδρες και τα 71 στις γυναίκες (Leow et.al, 2014). Η ηλικία φαίνεται ότι σχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος, υπό την έννοια ότι σε νέους ενήλικες (κάτω των 30), υπερτερούν οι ευνοϊκότερες ιστολογικές μορφές, κι αυτό αντανακλά τόσο στη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος, όσο και στην πρόγνωση. Όμως ο κίνδυνος εξέλιξης του καρκινώματος σε διηθητικό είναι ο ίδιος σ' όλες τις ηλικίες,, γεγονός που επιβεβαιώνει τη γενική αρχή ότι όλοι οι ασθενείς πρέπει να αντιμετωπίζονται με βάση το στάδιο και το βαθμό διαφοροποίησης της νόσου, ανεξαρτήτως ηλικίας (Gartrell and Snorvade, 2013).

Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συχνότητα τυχαίας διάγνωσης του καρκινώματος μεταξύ ζώντων και αποθανόντων ασθενών. Ετσι είναι αρκετά συχνή η τυχαία ανακάλυψη ενός όγκου στην κύστη κατά τη διάρκεια μιας κυστεοσκόπησης, που γίνεται για άλλο λόγο (πχ κατά τη διαγνωστική εκτίμηση της BPH), (Leow et.al, 2013) ενώ αντιθέτως σε υλικά νεκροτομών το φαινόμενο αυτό είναι πρακτικά ανύπαρκτο. Η διαφορά αυτή δηλώνει ότι, στην πράξη, όλα τα καρκινώματα της ουροδόχου κύστεως διαγιγνώσκονται πριν από το θάνατο του ανθρώπου, ίσως επειδή το ‘υποκλινικό στάδιο’ της νόσου είναι πολύ βραχύ.

2. Παράγοντες κινδύνου

Ο κύριος παράγοντας που σχετίζεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι το κάπνισμα. Οι καπνιστές έχουν τέσσερις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο της κύστης από ότι οι μη καπνιστές. Ο κίνδυνος έχει σχέση με τον αριθμό των τσιγάρων, τη διάρκεια του καπνίσματος και το βαθμό εισπνοής του καπνού. Ο κίνδυνος αφορά και τα δύο φύλα. Το ειδικό υπεύθυνο καρκινογόνο των τσιγάρων δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη. Είναι γνωστή η ύπαρξη των νιτροζαμινών, 2-ναφθυλαμίνης και 4-αμινομπιφαινύλης καθώς και η αυξημένη παρουσία στα ούρα των καπνιστών των μεταβολιτών της τρυπτοφάνης (Leow et.al, 2015). Το ενδιαφέρον έχει εστιασθεί στην 4-αμινομπιφαινύλη που βρίσκεται σε διάφορα βιομηχανικά χημικά και στον καπνό των τσιγάρων. Επειδή η ακετυλίωση του παράγοντα αυτού προάγει την έναρξη μιας διαδικασίας αποτοξίνωσης, οι μετρήσεις της ταχείας και βραδείας ακετυλίωσης των μεταβολιζομενων ουσιών με παρόμοιο τρόπο προς 4-αμινομπιφαινύλη, όπως η σουλφαμεθαζίνη και η καφεΐνη, με ανάλυση των ακετυλιωμένων ή μη κετυλιωμένων μεταβολιτών στα ούρα και το αίμα μετά από γνωστή περίοδο εισαγωγής της δοκιμασίας του φαρμάκου, έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο (Griffiths, 2013). Επαγγέλματα που αναφέρονται ότι συνοδεύονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου κύστης είναι: ζωγράφοι, οδηγοί φορτηγών, καθαριστές ρούχων, εργάτες μετάλλων, εργάτες επεξεργασίας χαρτιού, οδοντοτεχνίτες, κομμωτές, εργάτες ελαστικών και ελαιοχρωματιστές. Οι χρωστικές ανιλίνης είναι δυνητικά καρκινογόνα του ουροθηλίου. Άλλα καρκινογόνα για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως που έχουν αναφερθεί είναι: 2-ναφθυλαμίνη, βενζιδίνη, 2-αμινο-1-ναφθόλη, χλωριωμένοι αλιφατικοί υδρογονάνθρακες και διάφορες αλδεΐδες, όπως η ακρολεΐνη, που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες ελαστικών και υφαντουργίας. Εκτιμάται πως η επαγγελματική έκθεση ενοχοποιείται για το 20% των περιπτώσεων καρκίνου κύστης στις ΗΠΑ (Letasiova et.al, 2012). Τα πιο συχνά καρκινογόνα της κύστης είναι οι αρωματικές αμίνες, τα νιτρικά και τα νιτρώδη των τροφών, που ενεργοποιούνται από τη βακτηριακή εντερική χλωρίδα, θεωρούνται δυνητικά καρκινογόνοι παράγοντες.

Η λήψη μεγάλων ποσοτήτων αναλγητικών (5-15kg σε μια περίοδο 10 ετών) φαινακετίνης, η οποία έχει παρόμοια χημική σύσταση με αυτή των χρωστικών της ανιλίνης, συνοδεύεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο από μεταβατικά κύτταρα της νεφρικής πυέλου και της ουροδόχου κύστεως. Η συσχέτιση με άλλα αναλγητικά δεν έχει τεκμηριωθεί (Lee et.al, 2014). Άλλοι παράγοντες που ενέχονται στην ανάπτυξη καρκίνου της κύστης είναι η χρόνια κυστίτιδα, λόγω παρουσίας καθετήρα κύστης ή λίθου, γεγονός που συνοδεύεται με αυξημένο κίνδυνο για πλακώδες καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, η ακτινοβολία της ελάσσονος πυέλου, ιδιαίτερα σε γυναίκες με καρκίνο της μήτρας, ασθενείς που θεραπεύονται με κυκλοφωσφαμίδη (Cytosan) και η κληρονομικότητα, με βιβλιογραφική αναφορά μερικών οικογενών περιπτώσεων.

3. Ιστολογία του ουροθηλίου και προκαρκινικές καταστάσεις

Φυσιολογικό επιθήλιο

Ο βλεννογόνος της ουροδόχου κύστεως, όπως εξ' άλλου κι αυτός της νεφρικής πυέλου και του ουρητήρα, αποτελείται από μεταβατικό επιθήλιο (ουροθήλιο) και χόριο (Σομποτα, 2013)). Το ουροθήλιο απαρτίζεται από 3-7 σειρές κυττάρων, ανάλογα με το αν η κύστη είναι διατεταμένη ή όχι. Το κατώτερο στρώμα αποτελείται από τα βασικά κύτταρα, τα οποία άπτονται της βασικής μεμβράνης, είναι δε κύτταρα με μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Το κορυφαίο τμήμα αποτελείται από μεγάλα εξαγωνικά κύτταρα που μοιάζουν με ομπρέλλες. Τα κύτταρα αυτά είναι ενωμένα μεταξύ τους με ισχυρούς δεσμούς, σχηματίζοντας ένα φραγμό μεταξύ των ούρων και του υγρού των ιστών. Ο φραγμός αυτός φαίνεται ότι αφορά κυρίως το νερό και λιγότερο τα διάφορα ιόντα. Στη δημιουργία του φραγμού συμβάλλει και ένα στρώμα από γλυκοζαμινογλυκάνες που καλύπτει το στρώμα των κορυφαίων κυττάρων. Διακοπή αυτού του στρώματος αυξάνει τη διαβατότητα του ουροθηλίου στην ουρία και σε άλλες ουσίες και έχει συσχετισθεί με διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις της κύστεως, όπως πχ η διάμεση κυστίτιδα (Leow et.al, 2015).

Τα κύτταρα του ουροθηλίου εμφανίζουν πολικότητα, υπό την έννοια του κάθετου προσανατολισμού των πυρήνων τους προς τη βασική μεμβράνη (Σομποτα, 2013). Η απώλεια της πολικότητας των κυττάρων σχετίζεται με δυσπλασία ή καρκίνωμα *insitu* (CIS).

Ο υποβλεννογόνιος χιτώνας της κύστεως περιέχει την υποβλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, η οποία είναι διαφορετική από τον αληθινή μυϊκό χιτώνα της κύστεως. Η διάκριση αυτή έχει μεγάλη σημασία στην παθολογοανατομική σταδιοποίηση του καρκίνου της κύστεως.

Υπερπλασία

Ο όρος υποδηλώνει την αύξηση των κυτταρικών στρωμάτων του ουροθηλίου, χωρίς όμως να παρατηρείται απώλεια του προσανατολισμού ή αλλαγή στην αρχιτεκτονική του. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του 1998, η υπερπλασία διακρίνεται σε επίπεδη και θηλώδη (Mazzuchelli et.al, 2014). Η θηλώδης υπερπλασία έχει συσχετισθεί με προηγούμενη ή ταυτόχρονη ανάπτυξη θηλώδους όγκου στην ουροδόχο κύστη, χωρίς όμως να έχει διευκρινισθεί η ακριβής σχέση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων.

Ατυπη υπερπλασία (ατυπία)

Είναι η επιθηλιακή υπερπλασία που συνοδεύεται από ανωμαλίες του πυρήνα ή/ και διαταραχή στη διάταξη των κορυφαίων (umbrella-like) κυττάρων. Ατυπία του ουροθηλίου σε παρακείμενες ενός επιφανειακού όγκου θέσεις αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού όγκου στο μέλλον κατά 35-40 % (Mazzuchelli et.al, 2014).

Δυσπλασία

Το δυσπλαστικό επιθήλιο χαρακτηρίζεται από ιστολογική εικόνα η οποία είναι ενδιάμεση μεταξύ του φυσιολογικού και του καρκινώματος *insitu*: οι πυρήνες είναι μεγάλοι, στρογγυλοί και τα κύτταρα εμφανίζουν απώλεια του προσανατολισμού τους. Δεν υπάρχουν όμως πολλές μιτώσεις και ο αριθμός των κυτταρικών στρωμάτων του ουροθηλίου είναι φυσιολογικός (Mazzuchelli et.al, 2014). Στο παρελθόν προτάθηκε η διάκριση της δυσπλασίας σε ήπια, μέτρια και σοβαρή, στην ταξινόμηση όμως της WHO/ISUP του 1998 τέτοια διάκριση δεν προβλέπεται. Στην ταξινόμηση αυτή ως δυσπλασία ορίζεται η χαμηλού βαθμού κακοήθειας ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, ενώ ως CIS χαρακτηρίζεται η υψηλού βαθμού κακοήθειας ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία.

Οι Mostofi και Sesterhenn θεωρούν ότι όλες οι μορφές ατυπίας ή δυσπλασίας του ουροθηλίου πρέπει να θεωρούνται προκαρκινωματώδεις βλάβες (Gartner and Hiatt, 2011). Οι ίδιοι πρότειναν ότι οι όροι ατυπία, δυσπλασία και καρκίνωμα *insitu* πρέπει να αντικατασταθούν από τον όρο Bladder Intraepithelial Neoplasia και τις 3

διαβαθμίσεις του: BIN1 (ήπια ατυπία ή δυσπλασία), BIN2 (μέτρια ατυπία ή δυσπλασία) και BIN3 (σοβαρή ατυπία ή δυσπλασία και CIS). Η παραπάνω πρόταση όμως δεν έγινε ευρέως αποδεκτή.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανεύρεση δυσπλασίας (όπως και ατυπίας) σε παρακείμενες ενός όγκου θέσεις, είναι κακός προγνωστικός παράγοντας για την εξέλιξη του όγκου αυτού (Mazzuchelli et.al, 2014). Η συνύπαρξη δυσπλασίας ή/και CIS με επιφανειακό όγκο κύστεως επιδρά και στην εξέλιξη της νόσου σε διηθητική.

Μετάπλαση/μεταπλασία

Είναι η κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται κατά τόπους αλλαγή της εμφάνισης του ουροθηλίου από μεταβατικό σε πλακώδες (πλακώδης μετάπλαση), ή αδενικό (αδενική μετάπλαση). Πλακώδης μετάπλαση παρατηρείται φυσιολογικά στην περιοχή του κυστικού τριγώνου αρκετών γυναικών, πιθανόν εξ' αιτίας ορμονικών επιδράσεων αλλά και στο 10 % των υγιών ανδρών (Sun and Trihn, 2015). Αν και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η πλακώδης μετάπλαση μπορεί να είναι προκαρκινωματώδης βλάβη, φαίνεται ότι όταν δεν συνοδεύεται από κυτταρική ατυπία ή εκσεσημασμένη κερατινοποίηση, αποτελεί καλοήγη κατάσταση και στα δύο φύλα.

Φωλεές του von Brunn

Αποτελούν νησίδια επιθηλιακών κυττάρων στο χόριο, πιθανόν εξ αιτίας πολλαπλασιασμού και διείσδυσης των βασικών κυττάρων προς τα κάτω. Τα νησίδια μπορεί να συνδέονται με το ουροθήλιο (καταδύσεις) ή να είναι αποσπασμένα απ' αυτό. Οι φωλεές του vonBrunn απαντώνται φυσιολογικά στο 89 % των ουροδόχων κύστεων υγιών ατόμων (Harik and O' Toole, 2012), ενώ υπάρχουν ως φυσιολογική παραλλαγή του επιθηλίου και στην προστατική ουρήθρα. Η κλινική τους σημασία είναι άγνωστη.

Κυστική κυστίτις

Η κατάσταση αυτή μοιάζει με τις φωλεές του Von Brunn με τη διαφορά ότι το επιθήλιο στο κέντρο της φωλεάς έχει υποστεί ηωσινοφιλική νέκρωση. Παρατηρείται στο 60 % φυσιολογικών ουροδόχων κύστεων (Harik and O' Toole, 2012). Είναι τελείως διαφορετική από τη λεμφοζιδιακή κυστίτιδα, η οποία χαρακτηρίζεται από την υποβλεννογόνια ανάπτυξη λεμφοζιδίων εξ αιτίας χρόνιας μικροβιακής φλεγμονής.

Αδενική κυστίτις

Είναι ίδια με την κυστική κυστίτιδα, με τη διαφορά ότι εδώ συνυπάρχει και αδενική μετάπλαση του μεταβατικού επιθηλίου. Θεωρείται πρόδρομη μορφή του αδενοκαρκινώματος της ουροδόχου κύστεως (Harik and O' Toole, 2012)

Νεφρογενές αδένωμα

Είναι μία σπάνια αλλοίωση, συχνότερα απαντώμενη στους άνδρες, η οποία ιστολογικά αποτελείται από στοιχεία που προσομοιάζουν με νεφρικά αθροιστικά σωληνάκια. Θεωρείται είδος μετάπλασης του ουροθηλίου ως απάντηση σε διάφορους επιδρώντες παράγοντες. Δεν υπάρχει πυρηνική ατυπία ή έντονη μιτωτική δραστηριότητα (Kuzaka et.al, 2014). Παρόμοιο ιστολογικά, αλλά με διήθηση του υποβλεννογονίου, είναι το μεσονεφρικής προέλευσης αδενοκαρκίνωμα, το οποίο πολύ συχνά διηθεί και τη μυική στιβάδα.

Λευκοπλακία

Είναι η υπερπαραγωγή κερατίνης ουσίας σε εντοπισμένη περιοχή ενός βλεννογόνου. Στην περιοχή αυτή παρατηρείται όλη η εξέλιξη των πλακωδών κυττάρων, μέχρι του σχηματισμού κερατίνης, όπως ακριβώς συμβαίνει στην επιδερμίδα. Θεωρείται

προκαρκινωματώδης κατάσταση. Η ανεύρεσή της στην ουροδόχο κύστη είναι αρκετά συχνή σε περιπτώσεις λιθίασης, σχιστοσωμιάσης, μόνιμων καθετήρων ή χρόνιας κυστίτιδας. Η λευκοπλακία της κύστεως είναι πιθανό να εξελιχθεί σε καρκίνωμα πλακώδους επιθηλίου στο 20 % των ασθενών (Kuzaka et.al, 2014) .

Μετεγχειρητικό ατρακτοκυτταρικό οζίδιο ή ψευδοσάρκωμα
Είναι δυνατόν, αρκετούς μήνες μετά από κάποιο διαγνωστικό ή θεραπευτικό χειρισμό στο κατώτερο ουροποιητικό ή ακόμη και μετά από μία φλεγμονή, να αναπτυχθεί ένα οζίδιο, εξ αιτίας αντιδραστικού πολλαπλασιασμού μεσεγγυματογενών κυττάρων του υποστρώματος. Η βλάβη αυτή πολύ συχνά συγχέεται με κακοήγη νεοπλάσματα του συνδετικού ιστού (πχ λειομυοσαρκώματα).

Ανάστροφο θήλωμα

Το ανάστροφο θήλωμα αποτελεί καλοήγη βλάβη, η οποία συχνά αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής ή υποκυστικού κωλύματος. Εντοπίζεται συνήθως στο τρίγωνο ή τον αυχένα της κύστεως. Δημιουργείται όταν η ανάπτυξη ενός θηλώματος γίνεται ενδοφυτικά (δηλ. προς το ινομύδες στρώμα της κύστεως). Το υπερκείμενο ουροθήλιο είναι φυσιολογικό κι έτσι το ανάστροφο θήλωμα φαίνεται μακροσκοπικά σαν μικρό επηρμένο οζίδιο και όχι σαν εξωφυτικός όγκος. Σπανίως μπορεί να επισυμβεί κακοήγη εξαλλαγή του ανάστροφου θηλώματος.

3. Σταδιοποίηση - Βαθμός κακοήθειας

Η μεγάλη πλειονότητα των καρκίνων της ουροδόχου κύστεως (90%) είναι όγκοι από μεταβατικό επιθήλιο. Διακρίνονται στο καρκίνωμα *insitu* , στο επιφανειακό θηλώδες και στο διηθητικό.

Στα νεοπλάσματα από μη μεταβατικό επιθήλιο περιλαμβάνονται το αδενοκαρκίνωμα (2%), το πλακώδες (5-10%), το αδιαφοροποίητο (<2%), το μικτό αποτελούμενο από μεταβατικού, αδενικού και πλακώδους τύπου κύτταρα (4-6%) και άλλα σπανιότερα νεοπλάσματα.

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν προταθεί και μελετηθεί αρκετοί προγνωστικοί κλινικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων του σταδίου, του βαθμού διαφοροποίησης, της διήθησης των αγγείων, του αριθμού και του μεγέθους των νεοπλασμάτων, της συνύπαρξης καρκινώματος *insitu* και της ανάλυσης του DNA των καρκινικών κυττάρων. Από τους παράγοντες αυτούς το στάδιο της νόσου και ο βαθμός διαφοροποίησης αποτελούν τους πλέον σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν τη θεραπεία που πρέπει να εφαρμοστεί αλλά και την πιθανή πορεία της νόσου (Leow et.al, 2014)

Το σύστημα σταδιοποίησης που ακολουθείται είναι το προταθέν το 1997 από την UICC (Union International Centre of Cancer) και βασίζεται στη διάκριση TNM (Tumor-Node-Metastasis) δηλαδή στην αξιολόγηση της έκτασης του αρχικού όγκου, της κατάστασης των λεμφαδένων και της ύπαρξης μεταστάσεων. Αναλυτικά η TNM ταξινόμηση των κακοηθών νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 1).

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει καθιερωθεί η διάκριση των όγκων της ουροδόχου κύστεως σε επιφανειακούς και σε διηθητικούς. Ο όρος 'επιφανειακοί όγκοι' χρησιμοποιείται για να περιγράψει τους όγκους που δεν επεκτείνονται στο μυϊκό τοίχωμα και μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με τις κλασσικές ενδοσκοπικές μεθόδους. Περιλαμβάνει τρεις κατηγορίες νεοπλασμάτων: τα θηλώδη ουροθηλιακά που δε διηθούν το χόριο (pTa), τα καρκινώματα που διηθούν το χόριο χωρίς να επεκτείνονται στο μυϊκό χιτώνα (pT1) και τα καρκινώματα *insitu* (Tis).

Εν τούτοις με τις νεότερες ταξινομήσεις, όπως της κοινής επιτροπής WHO/ISUP του 1998 (World Health Organization/International Society of Urological Pathology), ένας όγκος, που διασπά τη βασική στιβάδα του επιθηλίου και επεκτείνεται («διηθεί») το χόριο δεν θεωρείται ως «επιφανειακός» αλλά «διηθητικός».

Πίνακας 1.

Ταξινόμηση TNM των όγκωνουροδόχου κύστης

Tx:	Όγκος που δεν μπορεί να αξιολογηθεί
TO:	Απουσία ανιχνεύσιμου όγκου
Tis:	Καρκίνωμα insitu
Tx:	Όγκος θηλώδης χωρίς διήθηση της βασικής επιθηλιακής μεμβράνης
T1:	Όγκος που διηθεί το χόριο
T2:	Διήθηση του μυϊκού χιτώνα
T2a:	Διήθηση του επιπολής μυϊκού χιτώνα
T2b:	Διήθηση του εν τω βάθει μυϊκού χιτώνα
T3:	Διήθηση του περικυστικού λίπους
T3a:	Διήθηση μικροσκοπική
T3b:	Διήθηση μακροσκοπική
T4:	Διήθηση γειτονικών οργάνων, πυελικού ή κοιλιακού τοιχώματος
T4a:	Διήθηση του προστάτη, της μήτρας ή του κόλπου
T4b:	Διήθηση του πυελικού ή κοιλιακού τοιχώματος
Nx:	Λεμφαδένες που δεν μπορούν να αξιολογηθούν
NO:	Απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων
N1:	Μονήρης λεμφαδένας < 2cm
N2:	Μονήρης λεμφαδένας από 2 έως 5αη, η πολλαπλοί λεμφαδένες < 5 cm
N3:	Λεμφαδένες > 5 cm
Mx:	Απομακρυσμένες μεταστάσεις που δεν μπορούν να αξιολογηθούν
Mo:	Απουσία μεταστάσεων
M1:	Παρουσία μεταστάσεων

Έχει διαπιστωθεί ότι το 70% έως 80% των ασθενών με πρωτοεμφανιζόμενο καρκίνο της ουροδόχου κύστης παρουσιάζεται με επιφανειακά νεοπλάσματα, με τους όγκους Ta να είναι οι συχνότεροι (40% των περιπτώσεων) ακολουθούμενοι από τους όγκους T1 (25-30% των περιπτώσεων) ενώ οι Tis βρίσκονται περίπου στο 2-5% των ασθενών. Ένα ποσοστό των ασθενών που φθάνει το 20% έχουν νεόπλασμα που διηθεί τη μυϊκή στιβάδα (μεγαλύτερο του T1) ενώ το 5 με 7% παρουσιάζονται με μεταστατική νόσο κατά τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης. Είναι προφανές ότι η κάθε κατηγορία παρουσιάζει τελείως διαφορετικά θεραπευτικά και προγνωστικά προβλήματα.

Τα επιφανειακά καρκινώματα αντιπροσωπεύουν μια οντότητα κακοηθών νεοπλασμάτων που χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη ετερογένεια τους και τη δυσκολία πρόγνωσης της φυσικής τους ιστορίας. Τα σημαντικά προβλήματα που παρουσιάζονται στην πορεία αυτών των όγκων είναι δύο: Ο κίνδυνος υποτροπής, χωρίς όμως αύξηση του βαθμού κακοήθειας και του σταδίου που παραμένουν ίδια ή βρίσκονται χαμηλότερα και ο κίνδυνος εξέλιξης της νόσου. Ο κίνδυνος υποτροπής στους ασθενείς με επιφανειακό νεόπλασμα είναι μεγαλύτερος του 60% αν αντιμετωπισθούν μόνο με διουρηθρική εκτομή και δεν συνεχίσουν με ενδοκυστική ανοσοθεραπεία ή χημειοθεραπεία. Συγκεκριμένα εκτιμάται ότι 52% των Ta όγκων και 77% των T1 θα υποτροπιάσουν αν δεν υποβληθούν σε συμπληρωματική θεραπεία.

Ως εξέλιξη θεωρείται η εμφάνιση υψηλότερου βαθμού κακοήθειας ή σταδίου σε σχέση με τον αρχικό όγκο. Ένα ποσοστό 30% έως 42% των υποτροπών θα δείξει

πρόοδο προς υψηλότερο στάδιο ή βαθμό κακοήθειας μέσα σε 10 χρόνια. Ο σημαντικότερος κίνδυνος εξέλιξης της νόσου είναι η διήθηση του μυϊκού χιτώνα οπότε το νεόπλασμα γίνεται διηθητικό με δυνατότητα μεταστάσεων και δυνητικά θανάτου των ασθενών.

Όσον αφορά το βαθμό κακοήθειας το 70% περίπου των ασθενών τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης έχουν χαμηλού βαθμού κακοήθειας νεοπλάσματα. Ο χαμηλότερος βαθμός κακοήθειας συνοδεύεται και από χαμηλό ποσοστό προόδου που είναι 2-10% για τα νεοπλάσματα βαθμού κακοήθειας 1, 11-19% για τα βαθμού κακοήθειας 2 και 33-45% για τα βαθμού 3, ενώ τα ποσοστά υποτροπής ανάλογα του βαθμού κακοήθειας είναι 63, 67 και 71% αντιστοίχως (Leow et.al, 2014). Επιπλέον ασθενείς με υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνο της κύστης στην αρχική διάγνωση παρουσιάζονται σε ποσοστό 50% με νεόπλασμα που διηθεί τη μυϊκή στιβάδα. Από τους ασθενείς αυτούς το 50% θα έχουν υποτροπή με μεταστατική νόσο μέσα σε 2 χρόνια και 60% θα πεθάνει σε 5 χρόνια παρά τη θεραπεία (Owens et.al, 2013).

Η πιθανότητα εξέλιξης της νόσου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες αλλά στην κορυφή της ιεραρχίας βρίσκονται ο βαθμός κακοήθειας. Με βάση τον βαθμό κακοήθειας οι ασθενείς κατατάσσονται σε ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου εξέλιξης. Στην ομάδα χαμηλού κινδύνου αποτελούμενη από όγκους T_a χαμηλού βαθμού κακοήθειας, μονήρεις, που δεν υποτροπίασαν μέσα σε 3 μήνες, ο κίνδυνος εξέλιξης στην πενταετία είναι 7,1% και θανάτου στη δεκαετία 4,3%. Στην ομάδα μεσαίου κινδύνου που περιλαμβάνει τους πολυεστιακούς T_a όγκους, τους T_a με πολλαπλές εστίες υποτροπής, τους μονήρεις όγκους T₁G₂ και T_aG₃, ο κίνδυνος εξέλιξης στην πενταετία και θανάτου στη δεκαετία είναι 17,4% και 12,8% αντίστοιχα. Τέλος για την ομάδα υψηλού κινδύνου όπου κατατάσσονται οι όγκοι T₁G₃, οι όγκοι T₁ που υποτροπίασαν σε διάστημα μικρότερο των 6 μηνών, οι πολυεστιακοί T₁ ανεξαρτήτως του βαθμού κακοήθειας και τα διάχυτα καρκινώματα T_{is}, ο κίνδυνος εξέλιξης ανέρχεται στο 41,6% στα 5 χρόνια και θανάτου στο 36,1% στα 10 χρόνια από την αρχική εμφάνιση της νόσου (Owens et.al, 2013). Αυτά τα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης χαρακτηρίζεται από την ετερογένεια στη βιολογική συμπεριφορά του ακόμα και για περιπτώσεις που θεωρητικά ανήκουν στην ίδια ομάδα κινδύνου, για αυτό ακριβής και αξιόπιστη πρόβλεψη της επιθετικότητας και του μεταστατικού δυναμικού της νόσου είναι δύσκολο να γίνει. Συνέπεια όλων των παραπάνω είναι οι ερευνητικές προσπάθειες να στρέφονται προς τον καθορισμό προγνωστικών παραγόντων που θα επιτρέπουν την ανίχνευση εκείνων των ασθενών που θα υποτροπιάσουν ή θα παρουσιάσουν πρόοδο της νόσου προκειμένου να υποβληθούν έγκαιρα στην κατάλληλη θεραπεία.

Καρκίνωμα in situ (CIS) μεταβατικού επιθηλίου

Είναι ένα χαμηλής διαφοροποίησης, μη διηθητικό καρκίνωμα, που εντοπίζεται στο επιθήλιο (flat carcinoma). Αποτελεί αλλοίωση με απρόβλεπτη συμπεριφορά αλλά με μεγάλο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό και θεωρείται η αρχική φάση στην εξέλιξη του διηθητικού καρκινώματος. Μπορεί να εμφανίζεται μόνο του ή να συνοδεύει πρωτοπαθείς ή υποτροπιάζοντες όγκους της ουροδόχου κύστεως, οποιουδήποτε βαθμού διαφοροποίησης (Griffiths, 2013). Εντοπίζεται κυρίως στο τρίγωνο και τη βάση της κύστεως, γύρω από τα ουρητηρικά στόμια και στον αυχένα, ενώ σπάνια είναι η εντόπισή του στο θόλο. Πολλές φορές CIS ανευρίσκεται και στις φωλεές του vonBrunner κι αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία διότι οι ενδοκυστικά χορηγούμενοι αντινεοπλασματικοί παράγοντες αδυνατούν να εισέλθουν στις θέσεις αυτές και να επηρεάσουν αποτελεσματικά τη βλάβη (Griffiths, 2013).. Ουροθηλιακό καρκίνωμα insitu αναφέρεται και σε θέσεις έξω από την ουροδόχο κύστη, όπως στην προστατική μούρα της ουρήθρας, σπερματοδόχους κύστες, έξω στόμιο της ουρήθρας κλπ Η συχνότητα ανεύρεσης CIS στην προστατική μούρα της ουρήθρας αναφέρεται μέχρι και

σε ποσοστό 36,8 % (93). Εξ' άλλου η ουρήθρα αποτελεί συχνή θέση ανάπτυξης CIS κι αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου, εφ' όσον αν δεν πραγματοποιηθεί και ουρηθρεκτομή μαζί με την αφαίρεση της κύστεως, είναι δυνατόν να αναπτυχθεί όγκος στη θέση αυτή, ο οποίος μάλιστα είναι και δύσκολα αντιμετωπίσιμος.

Το CIS σπανίως συνοδεύει καλώς διαφοροποιημένους όγκους. Αντίθετα είναι συχνό σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης (Kuzaka et.al, 2014). Οι διηθητικοί όγκοι συνοδεύονται από CIS σε ποσοστό μέχρι και 75 %. Μελέτες έδειξαν ότι ένα μεγάλο ποσοστό τόσο διηθητικών όγκων όσο και CIS παρουσιάζουν εξάλειψη ή μετάλλαξη του p53. Αυτό είναι μία ακόμη ένδειξη ότι το CIS είναι πρόδρομη μορφή του διηθητικού καρκίνου, αφού είναι γνωστό ότι στους επιφανειακούς όγκους δεν παρατηρούνται ανωμαλίες του p53 (Mazzuchelli et.al, 2014).

Η πιθανότητα μετατροπής ενός CIS σε διηθητικό καρκίνο υπολογίζεται κατά μέσο όρο σε 54 %. Ο Riddle και συν. παρατήρησε ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συμπεριφορά του εστιακού απ' το διάχυτο CIS, αφού το εστιακό εξελίσσεται σε διηθητικό όγκο σε ποσοστό 8%, ενώ το διάχυτο σε ποσοστό 78% (Griffiths, 2013).

Κλινικά το καρκίνωμα insitu εκδηλώνεται με ερεθιστικά κυρίως φαινόμενα (συχνουρία, νυκτουρία, επιτακτική ούρηση), τα οποία μπορεί να οδηγήσουν τη διαγνωστική σκέψη προς άλλες παθήσεις (BPH, ουρολοίμωξη, διάμεση κυστίτιδα, νευρογενή κύστη). Παρ' όλα αυτά το 25 % των αρρώστων είναι τελείως ασυμπτωματικοί. Όταν υπάρχουν έντονα ερεθιστικά φαινόμενα το διάστημα μέχρι την εξέλιξη σε διηθητικό όγκο είναι μικρότερο. Η κυστεοσκόπηση μπορεί να αποκαλύψει ερυθρότητα ή αυξημένη αγγείωση του βλεννογόνου καθώς επίσης και οιδηματώδεις περιοχές σαν βελούδο, αν και πολλές φορές η εξέταση είναι αρνητική για ευρήματα. Η κυτταρολογική εξέταση των ούρων αποβαίνει θετική στις πλείστες των περιπτώσεων (90 % σε πολυεστιακό CIS) , κι αυτό οφείλεται στην μειωμένη συνοχή μεταξύ των κυττάρων η οποία οδηγεί σε αποφολίδωσή τους. Η κυτταρομετρία ροής εκπλυμάτων της ουροδόχου κύστεως είναι ακόμη πιο ευαίσθητη ως δοκιμασία και αποβαίνει θετική μέχρι και στο 97 % των περιπτώσεων (Leow et.al, 2014).

Η ενδοκυστική χορήγηση BCG αποτελεί την αρχική θεραπευτική προσέγγιση του CIS. Η θεραπεία του καρκινώματος insitu εξετάζεται αναλυτικότερα στο ειδικό κεφάλαιο.

Καρκίνωμα πλακώδους επιθηλίου (SCC)

Το καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου (squamouscellcarcinoma) είναι μια επιθετική μορφή του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως με κακή πρόγνωση, αφού συνήθως τη στιγμή της διάγνωσης η νόσος είναι προχωρημένη. Η συχνότητά του διαφέρει σε διάφορα μέρη της γης. Στις χώρες της Δυτικής Ευρώπης και τις ΗΠΑ αποτελεί το 1-10 % των όγκων της κύστεως, (99-100), αλλά στην Αίγυπτο, όπου ενδημεί η σχιστοσωμίαση, το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 75 % (Griffiths, 2013). Εκτός από τη σχιστοσωμίαση ο χρόνιος ερεθισμός της κύστεως (από μόνιμο ουροκαθετήρα, λιθίαση ή χρόνιες και υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις) έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη SCC (Campbell-3). Η μορφή αυτή του καρκίνου έχει γενικά συσχετισθεί με την πλακώδη μετάπλαση του ουροθηλίου, παρά με το CIS. Η αναλογία πασχόντων ανδρών προς γυναίκες είναι 1,3-1,7/1, μικρότερη δηλαδή απ' αυτή του TCC (Gkirlemis et.al, 2014).

Η θεραπεία του SCC πρέπει να είναι εξ αρχής επιθετική. Συνιστάται ριζική κυστεκτομή με ή χωρίς προεγχειρητική ακτινοθεραπεία (103), που θα πρέπει να συνοδεύεται πάντα από ουρηθρεκτομή, λόγω του μεγάλου κινδύνου υποτροπής του καρκινώματος στην ουρήθρα (Gkirlemis et.al, 2014). Η χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική στο SCC.

Αδενοκαρκίνωμα

Τα αδενοκαρκινώματα αποτελούν το 0,5-2 % όλων των πρωτοπαθών όγκων της κύστεως (101). Διακρίνονται σε πρωτοπαθή και μεταστατικά. Στα πρωτοπαθή συμπεριλαμβάνονται και τα αδενοκαρκινώματα του ουραχού. Τα προερχόμενα από τον ουραχό αποτελούν το 1/3 όλων των αδενοκαρκινωμάτων της κύστεως (105). Ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος μπορεί να συμβεί και σε εντερικά τμήματα που χρησιμοποιούνται στις εντεροκυστεοπλαστικές ή για τη δημιουργία νεοκύστεων.

Τα πρωτοπαθή αδενοκαρκινώματα έχουν συσχετισθεί με χρόνια φλεγμονή και ερεθισμό της κύστεως, καθώς και με τη σχιστοσωμίαση (αν και σε μικρότερο βαθμό από το SCC). Ισχυρή συσχέτιση φαίνεται ότι υπάρχει με την αδενική κυστίτιδα. Πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα αναπτύσσεται σε εκτροφή της κύστεως και μάλιστα οι όγκοι αυτού του τύπου αποτελούν το 85 % όλων των όγκων που αναπτύσσονται σ' αυτή τη σοβαρή συγγενή βλάβη (Gartrell, 2013, Griffith, 2013). Η αποβολή βλέννης με τα ούρα αποτελεί συχνό σύμπτωμα του αδενοκαρκινώματος, επειδή ο όγκος είναι βλεννοπαραγωγός. Γενικά τα αδενοκαρκινώματα έχουν κακή πρόγνωση. Η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία δεν βοηθούν, ενώ η ριζική κυστεκτομή αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο θεραπείας.

Τα αδενοκαρκινώματα του ουραχού είναι εξαιρετικά σπάνιοι όγκοι, οι οποίοι εξορμούνται από υπολείμματα του ουραχού στο τοίχωμα της κύστεως, οπότε κυστεοσκοπικά δίνουν την εικόνα υποβλεννογονίας μάζας στο θόλο. Αν η διήθηση αφορά και το ουροθήλιο τίθεται θέμα διαφορικής διάγνωσης από το μη προερχόμενο από τον ουραχό πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα (Griffiths, 2013). Η πρόγνωση είναι κι εδώ κακή. Θεραπευτικώς η μερική κυστεκτομή με ταυτόχρονη αφαίρεση του ουραχού, του περιτοναίου, της εγκαρσίας περιτονίας και του προσθίου κοιλιακού τοιχώματος έχει δώσει καλά αποτελέσματα.

Σπάνια στην ουροδόχο κύστη αναπτύσσονται μεταστατικά αδενοκαρκινώματα, των οποίων η πρωτοπαθής εστία εντοπίζεται κυρίως στο ορθό, στόμαχο, προστάτη, μαστό.

Μικροκυτταρικό καρκίνωμα

Εμφανίζεται με συχνότητα μικρότερη του 1 % όλων των όγκων της κύστεως. Ο όγκος θεωρείται ότι προέρχεται είτε από κακοήγη εξαλλαγή νευροενδοκρινικών κυττάρων, που υπάρχουν φυσιολογικά και στην ουροδόχο κύστη, είτε από κάποιο κοινό αρχέγονο μητρικό κύτταρο, που έχει τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε διάφορους ιστολογικούς τύπους (Leow et.al, 2014). Είναι όγκος επιθετικός. Οι περισσότερες περιγραφείσες, μέχρι σήμερα, περιπτώσεις ήταν σταδίου T3. Ο όγκος συχνότερα εντοπίζεται στα πλάγια τοιχώματα και είναι μεγάλος, συμπαγής, άμισχος ή πολυποειδής, με περιοχές νέκρωσης. Η θεραπεία περιλαμβάνει την ριζική κυστεκτομή ακολουθούμενη από συστηματική χημειοθεραπεία, λόγω του υψηλού μεταστατικού δυναμικού του όγκου. Η πρόγνωση είναι πτωχή (πενταετής επιβίωση 8 %) (Jani et.al, 2015).

Άλλοι όγκοι

Στην ουροδόχο κύστη έχουν περιγραφεί διάφοροι όγκοι επιθηλιακής και μη προελεύσεως. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει το λαχνωτό αδένωμα, οι καρκινοειδείς όγκοι, το μελάνωμα και το καρκινοσάρκωμα. Το τελευταίο είναι πολύ επιθετικός όγκος που περιέχει τόσο επιθηλιακά όσο και μεσεγχυματικά στοιχεία. Η πρόγνωση είναι κακή (πενταετής επιβίωση μικρότερη του 20 %) (Jani et.al, 2015).

Στους μη επιθηλιακούς όγκους περιλαμβάνεται το φαιοχρωμοκύτωμα, το πρωτοπαθές λέμφωμα καθώς και διάφοροι μεσεγχυματικοί όγκοι (σάρκωμα, λειομυοσάρκωμα, ραβδομυοσάρκωμα κλπ).

5. Κατάταξη των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης με βάση το βαθμό κακοήθειας

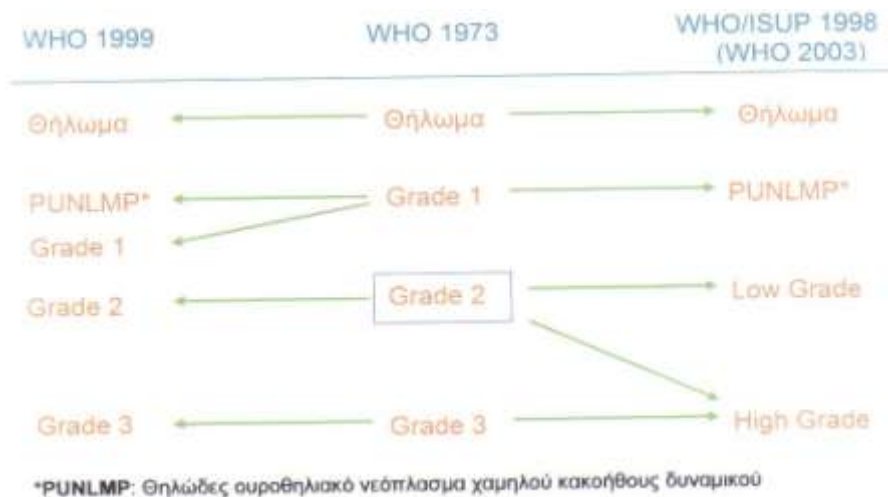
Ο βαθμός κακοήθειας βασίζεται στην εκτίμηση των αρχιτεκτονικών (ανωμαλία στο κυτταρικό σχήμα, διαταραχή της πολικότητας των κυττάρων, αδυναμία διαφοροποίησης από τη βάση προς την επιφάνεια) και κυτταρολογικών ανωμαλιών (πυρηνικές ανωμαλίες, μιτώσεις) του ουροθηλίου χωρίς να λαμβάνει υπόψη το διηθητικό ή μη χαρακτήρα του όγκου. Σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου και αποτελεί ένα προγνωστικό παράγοντα σημαντικό κυρίως για τους όγκους T_a και T₁ όπου μπορεί να δώσει πληροφορίες για την πιθανότητα διήθησης του κυστικού τοιχώματος. Αντίθετα οι διηθητικοί όγκοι εμφανίζουν βαθμό κακοήθειας G3 στο 70 με 75% των περιπτώσεων και βαθμό G2 στο 25% (Owens et.al, 2013). Οι περιορισμοί της ταξινόμησης ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας οφείλονται κυρίως στις διαφορετικές αξιολογήσεις που παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών ή και του ίδιου εξεταστή ή την ύπαρξη εστιών διαφορετικής διαφοροποίησης στον ίδιο όγκο. Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η πρόγνωση της νόσου εξαρτάται από το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης αν και οι δύο αυτοί παράγοντες είναι στενά συνδεδεμένοι όπως έχει ήδη δειχθεί (Owens et.al, 2013).

Νέες ταξινομήσεις των όγκων της κύστεως με βάση το βαθμό κακοήθειας, που αντιπροσωπεύουν την ανανέωση και ενημέρωση με νέα δεδομένα της ταξινόμησης της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Λ/ΗΟ) του 1973, που θεωρείτο σαν η ταξινόμηση αναφοράς.

- Η ταξινόμηση της κοινής επιτροπής WHO/ISUP του 1998 (World Health Organization /International Society of Urological Pathology), του 1998 που σε σχέση με την ταξινόμηση της Λ/ΗΟ, τροποποιεί την ορολογία των θηλωματωδών όγκων εκτιμώντας ότι ο όρος «καρκίνωμα» δεν είναι κατάλληλος για τα νεοπλάσματα G1 αν ληφθεί υπόψη η εξαιρετική τους πρόγνωση και εισάγει τη διάκριση: θήλωμα, όγκοι χαμηλού κακοήθους δυναμικού (Low Malignant Potential, LMP) και θηλώδη καρκινώματα χαμηλού και υψηλού βαθμού κακοήθειας (Owens et.al, 2013)

- Η ταξινόμηση Λ/ΗΟ του 1999, που προσθέτει μια επιπλέον κατηγορία στην κλίμακα των βαθμών διαφοροποίησης με μια ανακατάταξη των θηλωματωδών όγκων σε 5 κατηγορίες. Η ταξινόμηση αυτή διατηρεί την κατηγορία των όγκων LMP WHO/ISUP του 1998) και τους 3 βαθμούς κακοήθειας (G1, G2, G3) της ταξινόμησης της WHO 1973 για τα καρκινώματα (Owens et.al, 2013)

Οι δύο αυτές ταξινομήσεις που έγιναν σε διάστημα ενός έτους δεν μπορούν να θεωρηθούν ότι αντικαθιστούσαν οριστικά την προηγούμενη ταξινόμηση. Ο Cheng και Bostwick σχολιάζοντας τις νέες ταξινομήσεις, αντιμετώπισαν κριτικά τον όρο όγκοι δυνητικά χαμηλής κακοήθειας και θεωρούσαν ότι έπρεπε να καταργηθεί γιατί αφορά νεοπλάσματα με δυναμικό υποτροπής και προόδου μη αμελητέο (Owens et.al, 2013, Jian et.al, 2015)



Πίνακας 2: Αντιστοιχία των ταξινομήσεων των ουροθηλιακών νεοπλασμάτων

*PUNLMP: θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού

Στον πίνακα 2 φαίνονται σχηματικά οι αντιστοιχίες των κατηγοριών στις οποίες κατανέμονται τα ουροθηλιακά νεοπλάσματα από τις αναφερθείσες ταξινομήσεις.

Απαιτείται παρακολούθηση των ασθενών για μεγάλο χρονικό διάστημα προκειμένου να εκτιμηθεί και αξιολογηθεί η όποια κλινική και πρακτική αξία των νέων αυτών ταξινομήσεων έναντι του παλαιότερου σχήματος των τριών βαθμών κακοήθειας 01, 02 και 03. Από την άλλη πλευρά η ταξινόμηση του 2003, περιλαμβάνει τρεις ξεχωριστές κατηγορίες με βελτιωμένη περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών για την αποφυγή ασαφούς ή διαφορούμενης διαβάθμισης. Η κατηγορία LMP περιλαμβάνει ασθενείς με νεοπλάσματα χαμηλού κακοήθους δυναμικού. Οι νέες ταξινομήσεις αντιπροσωπεύουν ακόμη εργασία σε εξέλιξη με πιθανή ανάγκη νέων τροποποιήσεων αλλά η WHO πιστεύει ότι συνεπής χρήση της πρόσφατης ταξινόμησης θα έχει σαν αποτέλεσμα την ομοιόμορφη διάγνωση των όγκων και θα διευκολύνει τη σύγκριση κλινικών και παθολογοανατομικών μελετών και την ενσωμάτωση μοριακών πληροφοριών σχετικά με τη γενετική σταθερότητα των όγκων της κύστεως (Owens et.al, 2013)

6. Κλινική προσέγγιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Η μακροσκοπική ανώδυνη αιματουρία αποτελεί το πρώτο σύμπτωμα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης σε ένα ποσοστό 85-90% αυτών των ασθενών. Η αιματουρία μπορεί να είναι μικροσκοπική, διαλείπουσα ή συνεχής. Σ' ένα μικρό ποσοστό ασθενών μπορεί να συνυπάρχουν κυστικά ενοχλήματα, συχνουρία, επιτακτική ούρηση και δυσουρία και είναι δυνατόν να υποδηλώνουν την παρουσία ενός διάχυτου καρκινώματος in situ. Άλλα συμπτώματα είναι δυνατόν να προκληθούν από την επέκταση της νόσου, όπως συμπτώματα νεφρικής ανεπάρκειας ή ανουρία από τη διήθηση του τριγώνου, συμπτώματα από διήθηση παρακείμενων σπλάγγων και συμπτώματα από μεταστάσεις. (Lucca et.al, 2015)

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η διάγνωση του όγκου της ουροδόχου κύστεως στηρίζεται στο συνδυασμό επεμβατικών και μη επεμβατικών μεθόδων. Οι μη επεμβατικές μέθοδοι είναι η κλινική εξέταση, η αμφίχειρη υπό νάρκωση δακτυλική εξέταση της κύστης, η αναζήτηση διαφόρων βιολογικών δεικτών (νεοπλασματικών) στο αίμα ή στα ούρα, η αναζήτηση και η αξιολόγηση μορφολογικών και άλλων αλλαγών σε αποφολιδούμενα κύτταρα του ουροθηλίου στα ούρα ή σε εκπλύματα της ουροδόχου κύστης, και οι διάφορες απεικονιστικές μέθοδοι (απλή ακτινογραφία, ενδοφλέβια ουρογραφία με κυστεογραφία, υπολογιστική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία). Οι επεμβατικές μέθοδοι είναι η κυστεοσκόπηση και η λήψη βιοψιών, η διουρηθρική υπερηχογραφία, η λεμφαγγειογραφία και η παρακέντηση λεμφαδένων.

Η σειρά των εξετάσεων που συνήθως ακολουθείται για τη διάγνωση του καρκίνου της κύστης είναι : κλινική εξέταση, υπερηχογράφημα κύστης, ενδοφλέβια ουρογραφία, κυστεοσκόπηση και λήψη βιοψιών.(Leow et.al, 2015)

Η κλινική εξέταση βοηθά περισσότερο στους διηθητικούς και μεταστατικούς όγκους, όπου η δακτυλική εξέταση ελέγχει τη διήθηση προς το ορθό και η ψηλάφηση του υπογαστρίου ελέγχει την κυστική και περικυστική διήθηση της νόσου. Το διακοιλιακό υπερηχοτομογράφημα θα βοηθήσει στην ανίχνευση βλαβών διαμέτρου 2-5 cm, με ποσοστό επιτυχίας μέχρι και 80%. Ο συνδυασμός του με διορθικό υπερηχοτομογράφημα αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου στο 95%, ενώ όταν συνδυαστεί με κυτταρολογική εξέταση μπορεί να φθάσει το 100%.

Η ενδοφλέβια ουρογραφία είναι απαραίτητη τόσο για τη διάγνωση του καρκίνου της κύστης, όσο και για τη συμβολή της στην απεικόνιση των όγκων της ανώτερης αποχετευτικής μούρας και στη διερεύνηση της αποφρακτικής ουροπάθειας

Η αξονική τομογραφία αν και δεν αναφέρεται στις απεικονιστικές μεθόδους πρώτης γραμμής, ωστόσο αποτελεί σήμερα το πιο χρήσιμο διαγνωστικό μέσο για τη σταδιοποίηση των όγκων εκτιμώντας την κατάσταση των πυελικών και κοιλιακών λεμφαδένων.

Η κυστεοσκόπηση είναι η εξέταση που θα θέσει την τελική διάγνωση. Δίνει τη δυνατότητα να διαγνωσθεί όγκος που δεν φαίνεται στην κυστεογραφία, να εξετασθούν πολλοί από τους χαρακτήρες των όγκων, να ταυτοποιηθεί η συνύπαρξη φλεγμονής, το μέγεθος, η θέση, η πολλαπλότητα και η διηθητικότητα των όγκων και ακόμη επιτρέπει την εκτίμηση της κατάστασης των ουρητηρικών στομίων. Η κυστεοσκόπηση θα πρέπει πάντοτε να συνοδεύεται και από ουρηθροσκόπηση για έλεγχο της ουρήθρας. Τέλος, με τη λήψη βιοψιών τόσο από τον όγκο, όσο και από τις γύρω από αυτόν περιοχές μπορούμε να έχουμε τον ιστολογικό τύπο αυτού, το βαθμό διαφοροποίησης του και έλεγχο για την πιθανότητα συνύπαρξης καρκινώματος in situ (ΚΩΣΤΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, 2003)

Διάγνωση

Κλινική εικόνα

Το συχνότερο σύμπτωμα με το οποίο εμφανίζεται ο καρκίνος της κύστεως είναι η ανώδυνη αιματουρία, η οποία παρατηρείται στο 85 % των ασθενών. Η αιματουρία μπορεί να είναι είτε μακροσκοπική, είτε μικροσκοπική και συχνότερα είναι διαλείπουσα, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία στη διάγνωση της νόσου, εφ' όσον μία αρνητική για αιμοσφαιρίνη γενική εξέταση ούρων πρακτικά δεν αποκλείει τη νόσο (Jian et.al, 2015). Ερεθιστικά συμπτώματα, όπως συχνουρία, νυκτουρία ή επιτακτική ούρηση είναι συχνότερα σε CIS ή διηθητικό όγκο. Σπανιότερα η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με οσφυϊκό πόνο (είτε από οπισθοπεριτοναϊκές λεμφαδενικές μεταστάσεις, είτε από ουρητηρική απόφραξη), με οίδημα των κάτω άκρων ή ακόμη και με ψηλαφητή μάζα (σε τοπικά προχωρημένη νόσο). Η απώλεια βάρους χαρακτηρίζει τα τελικά στάδια της νόσου.

Εργαστηριακή διερεύνηση

Υπερηχογράφημα

Ο ρόλος του υπερηχογραφήματος στη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι πολύ σημαντικός. Πρακτικά όλοι οι ασθενείς με μακροσκοπική ή μικροσκοπική αιματοουρία υποβάλλονται αρχικά σε υπερηχοτομογραφικό έλεγχο. Οι όγκοι της κύστεως αναγνωρίζονται σαν υπερηχογενείς μάζες που προβάλλουν στον αυλό. Το διακοιλιακό υπερηχογράφημα έχει ευαισθησία 90-92 % στη διάγνωση του κυστικού καρκίνου (Sun and Trihn, 2015). Αντίθετα ο ρόλος του είναι μικρός στη διάγνωση της νόσου στον ουρητήρα. Ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία (96-100 %) έχει το διουρηθρικό υπερηχογράφημα, το οποίο όμως δεν χρησιμοποιείται ευρέως, όπως άλλωστε και το διορθικό (ευαισθησία 91 %).

Ενδοφλέβια ουρογραφία

Αποτελεί αναντικατάστατη εξέταση στην εκτίμηση ενός ασθενούς με αιματοουρία. Η αξία της έγκειται κυρίως στην μελέτη του ανώτερου ουροποιητικού, όπου μπορεί να αποκαλύψει κάποια απόφραξη ή ένα έλλειμμα σκιαγραφίσεως, που μπορεί να οφείλονται σε όγκο. Η ευαισθησία της είναι μικρότερη απ' αυτή του υπερηχογραφήματος στη διάγνωση των όγκων της κύστεως, κι εδώ όμως μπορεί να αποκαλύψει ελλείμματα σκιαγραφίσεως ή ασύμμετρη διάταση της κύστεως, εικόνες που είναι ενδεικτικές επιφανειακού ή διηθητικού όγκου αντίστοιχα (Sun and Trihn, 2015). Η ενδοφλέβια ουρογραφία μπορεί ίσως να παραληφθεί σε ασθενείς με πρωτοεμφανιζόμενο όγκο κύστεως, επειδή η πιθανότητα ύπαρξης όγκου στο ανώτερο ουροποιητικό είναι πολύ μικρή (Sun and Trihn, 2015). έχει όμως απόλυτη ένδειξη επί υποτροπής αφού τα νεοπλάσματα της νεφρικής πυέλου και του ουρητήρα μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη όγκου της κύστεως σε ποσοστό 30-50 % (Jian et.al, 2015, Sun and Trihn, 2015).

Κυτταρολογική εξέταση ούρων

Αποτελεί χρήσιμη διαγνωστική μέθοδο, κυρίως για την ανίχνευση εκείνων των όγκων της ουροδόχου κύστεως που δεν αναγνωρίζονται κυστεοσκοπικά (Κωστακοπουλος, 2003). Βασίζεται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μειωμένη συνοχή και κατά συνέπεια αποφολιδώνονται εύκολα, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται στα ούρα, με βάση και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους (αυξημένο μέγεθος πυρήνα, εμφανές πυρήνιο, αθροίσεις χρωματίνης κλπ). Η αποφολίδωση είναι μικρότερη στους καλώς διαφοροποιημένους όγκους, αφού τα κύτταρά τους συνδέονται με ισχυρούς δεσμούς και επομένως η κυτταρολογική ούρων είναι στις περιπτώσεις αυτές λιγότερο αξιόπιστη (υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών ευρημάτων). Η ικανότητα της κυτταρολογικής ούρων να ανιχνεύει έναν grade I όγκο κυμαίνεται από 22-62 % Ακόμη όμως και στους χαμηλής διαφοροποίησης όγκους παρατηρούνται ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε ποσοστό μέχρι και 20 % (Jian et.al, 2015)

Η αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων είναι ευκολότερη όταν αυτά διαφέρουν επαρκώς από τα φυσιολογικά, είναι δηλ. χαμηλότερου ιστολογικού βαθμού κακοήθειας (Jian et.al, 2015). Εξ άλλου και η ανίχνευσή τους είναι πιθανότερη όταν ο όγκος από τον οποίο προέρχονται είναι μεγάλος και αποφολιδώνει πολλά κύτταρα. Η παραμονή κυττάρων στα ούρα για μεγάλο χρονικό διάστημα οδηγεί στην εκφύλισή τους και επομένως τα πρώτα πρωινά ούρα δεν αποτελούν κατάλληλο δείγμα για την πραγματοποίηση κυτταρολογικής εξέτασης (Leow et.al, 2014). Η διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου αυξάνεται από 65 σε 87% όταν αντί για ένα εξετασθούν τρία δείγματα ούρων. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε ποσοστό 1-12 % και μπορεί να οφείλονται σε λιθίαση, φλεγμονή, τραύμα από προηγούμενες χειρισμούς στη κύστη, εξέλκωση του βλεννογόνου, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ενδοκυστικές εγχύσεις BCG κλπ (Turker and Turkeri, 2013).

Η κυτταρολογική εξέταση εκπλυμάτων της κύστεως είναι πιο ακριβής διαγνωστική μέθοδος διότι οι μηχανικοί χειρισμοί οδηγούν σε αποβολή περισσότερων κυττάρων, γεγονός που διευκολύνει την αναγνώριση των νεοπλασματικών (Leow et.al, 2014).

Κυτταρομετρία ροής

Με τη μέθοδο αυτή μετράται το ποσό του DNA που περιέχεται σ' έναν κυτταρικό πληθυσμό. Έτσι μπορεί να υπολογισθεί η πλοειδικότητα αυτού του πληθυσμού καθώς και η πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των κυττάρων του. Τα κύτταρα βάφονται με μία χρωστική η οποία συνδέεται με το DNA του πυρήνα. Η πρόσπτωση ακτίνας laser έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με το περιεχόμενο ποσό του DNA των κυττάρων. Τα φυσιολογικά κύτταρα περιέχουν σταθερό ποσό DNA στον πυρήνα τους, λόγω του ότι έχουν ορισμένο αριθμό χρωματοσωμάτων, είναι δηλαδή ευπλοειδικά. Αντίθετα τα κύτταρα ενός όγκου μπορεί να είναι είτε ευπλοειδικά (διπλοειδικά ή πολυπλοειδικά), είτε ανευπλοειδικά (όταν περιέχουν παθολογικό αριθμό χρωματοσωμάτων και άρα και μη κανονικό ποσό DNA). Κατ' επέκταση και οι όγκοι χαρακτηρίζονται ως διπλοειδικοί, πολυπλοειδικοί και ανευπλοειδικοί. Η πλοειδικότητα ενός όγκου σχετίζεται σε βαθμό στατιστικά σημαντικό τόσο με την πιθανότητα υποτροπής και εξέλιξης του, όσο και με την επιβίωση του ασθενούς (Reuter, 2006), εφ' όσον οι διπλοειδικοί όγκοι είναι συνήθως καλά διαφοροποιημένοι και έχουν καλή πρόγνωση, σε αντίθεση με τους ανευπλοειδικούς που έχουν πτωχή πρόγνωση. Οι τετραπλοειδικοί όγκοι έχουν συνήθως ενδιάμεση πρόγνωση.

Εκτός από την ανίχνευση ενός ανευπλοειδικού πληθυσμού με την κυτταρομετρία ροής μπορεί να υπολογισθεί το ποσό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση της σύνθεσης του DNA (φάση S), η οποία αντανάκλα την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα του κυττάρου. Σ' ένα φυσιολογικό κυτταρικό πληθυσμό τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S δεν ξεπερνούν το 10 %. Η ανεύρεση επομένως τέτοιων κυττάρων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10 ή 15 % δηλώνει την ύπαρξη καρκίνου, αν και πολλές φορές αυτό δεν καταδεικνύεται ακόμη και σε επιθετικούς όγκους (Reuter, 2006).

Η διαγνωστική ακρίβεια της κυτταρομετρίας ροής είναι περίπου 80 % Το ποσοστό αυτό είναι χαμηλότερο σε lowgrade όγκους, που συνήθως είναι διπλοειδικοί και συχνά δίνουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Αντίθετα το CIS και οι highgrade όγκοι ανιχνεύονται σε ποσοστό 80-90 % (Reuter, 2006, Jian et;al, 2015). Επομένως η χρησιμότητα της μεθόδου βρίσκεται στην ανίχνευση αυτών των όγκων.

Ανάλυση εικόνας (Image analysis cytometry)

Με τη μέθοδο αυτή, όπως και με την κυτταρομετρία ροής, ανιχνεύεται η πλοειδικότητα των κυττάρων ενός όγκου. Η ανάλυση εικόνας όμως θεωρείται πιο ευαίσθητη διαγνωστική μέθοδος κι αυτό ισχύει κυρίως για την ανίχνευση όγκων με μικρό αριθμό ανευπλοειδικών κυττάρων ανάμεσα σε μεγάλο αριθμό διπλοειδικών (Reuter, 2006). Η κυτταρομετρία ροής ανιχνεύει αυτούς τους όγκους ως διπλοειδικούς (χαμηλή ευαισθησία). Με την ανάλυση εικόνας όμως το κάθε κύτταρο εξετάζεται χωριστά και υπολογίζεται η πλοειδικότητά του ανεξάρτητα από τα άλλα, με τελικό αποτέλεσμα την ακριβέστερη διάγνωση ενός όγκου. Παρ' όλα αυτά και η μέθοδος αυτή στερείται ευαισθησίας στους lowgrade όγκους.

BTA test

Το BTA test είναι μία δοκιμασία συγκολλησεως (latex agglutination assay), με την οποία είναι δυνατή η ποιοτική ανίχνευση στα ούρα του λεγόμενου “αντιγόνου του όγκου” (bladder tumour antigen) που αποτελείται από συμπλέγματα της βασικής

μεμβράνης του ουροθηλίου. Κατά τη φάση της προσκόλλησης ενός όγκου στη βασική μεμβράνη τα νεοπλασματικά κύτταρα εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα (κολλαγενάσες και λαμινάσες) τα οποία διασπών τη βασική μεμβράνη σε πολυπεπτιδικά συμπλέγματα μοριακού βάρους 16-165 kD, τα οποία απεκκρίνονται στα ούρα και είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με το BTAtest (Lokeshwar and Solowa, 2001). Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η μέθοδος έχει υψηλή ειδικότητα (96%), αλλά χαμηλή ευαισθησία (40%). Πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ και την Αυστραλία έδειξε ότι η μέθοδος είναι ανώτερη της κυτταρολογικής ούρων (123), ενώ και μία Ευρωπαϊκή μελέτη κατέληξε στο ίδιο συμπέρασμα. Στην τελευταία, η συνολική ευαισθησία του BTA test ήταν 54% (έναντι 28% της κυτταρολογικής ούρων), αλλά στους Τα όγκους τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 33% και 20%, ενώ στους grade I η ευαισθησία ήταν 30% και 20% αντίστοιχα. Οι προσπάθειες βελτίωσης του test οδήγησαν στη δημιουργία των BTA stat και BTA TRAK, τα οποία ανιχνεύουν ένα διαφορετικό αντιγόνο την πρωτεΐνη human complement factor-H-related protein (hCFHrp) που έχει παρόμοια δομή και λειτουργία με τον human complement factor-H, αλλά παράγεται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα και όχι από το φυσιολογικό ουροθήλιο. Το BTA stat είναι ποιοτική, ενώ το BTATRAK είναι ποσοτική μέθοδος (ELISA) ανίχνευσης αυτής της πρωτεΐνης. Η ευαισθησία του BTA stat κυμαίνεται από 65-67% και η ειδικότητά του από 64-72%, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το BTA TRAK είναι 66-72% και 69-75% (Lokeshwar and Solowa, 2001) κι εδώ όμως οι καλώς διαφοροποιημένοι όγκοι ανιχνεύονται σε σαφώς μικρότερο ποσοστό.

NMP22

Οι NMP (Nuclear Matrix Proteins) είναι τμήματα του σκελετού του πυρήνα του κυττάρου και φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων. Ειδικά η NMP22 είναι μία “μιτωτική” πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της σωστής κατανομής των χρωματίδων στα θυγατρικά κύτταρα. Βρίσκεται τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα του ουροθηλίου, αλλά η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της είναι τουλάχιστον 25πλάσια στα δεύτερα (Gray and Simms, 2004). Με τον κυτταρικό θάνατο η πρωτεΐνη απελευθερώνεται στα ούρα, όπου μπορεί να ανιχνευθεί ποσοτικά με ELISA. Η χρησιμότητά της ως καρκινικού δείκτη έχει μελετηθεί σε διάφορες ερευνητικές εργασίες. Σε πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ βρέθηκε ότι η NMP22 είναι ισχυρός προγνωστικός δείκτης υποτροπής ενός όγκου μετά την TURP, με ευαισθησία 100% για τους διηθητικούς και 70% για τους επιφανειακούς όγκους. Αλλά και ως διαγνωστικός δείκτης η NMP22 παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (68-91% σε διάφορες μελέτες), η οποία είναι ανώτερη της κυτταρολογικής ούρων.

Τελομεράση

Τα τελομερή είναι ειδικές δομές που εντοπίζονται στα τελικά άκρα των χρωματοσωμάτων των σπονδυλωτών, παρέχοντας σταθερότητα σ' αυτά. Φυσιολογικά, με την πάροδο της ηλικίας, παρατηρείται μία προοδευτική αποδόμηση των τελομερών. Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο που ανευρίσκεται στα γεννητικά κύτταρα, αλλά εκφράζεται και σε πολλούς όγκους. Η κύρια δράση της είναι να επεκτείνει τα τελομερή κι αυτό επιτυγχάνεται με τη συνεχή προσθήκη εξαμερών TTAGGG στα άκρα των χρωματοσωμάτων. Μ' αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η κυτταρική γήρανση. Πρόσφατες μελέτες, με τη χρήση PCR, έχουν δείξει ότι δραστηριότητα τελομεράσης δεν ανιχνεύεται σε ασθενείς με καλοήθεις παθήσεις του ουροποιητικού (Chen and Chen, 2011). Επιπροσθέτως βρέθηκε ότι τα grade I και II TCC ανιχνεύονται σε στατιστικά σημαντικότερο βαθμό με τη μέθοδο αυτή, σε σύγκριση με τις ήδη χρησιμοποιούμενες. Η τελομεράση δεν χρησιμοποιείται ακόμη ευρέως στην κλινική πράξη.

Άλλοι δείκτες

Τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί η ερευνητική προσπάθεια ανεύρεσης ουσιών οι οποίες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, υπό την έννοια ότι θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν σε μεγάλο βαθμό την διαγνωστική κυστεοσκόπηση, ή τουλάχιστον να μεγαλώσουν το μεταξύ δύο κυστεοσκοπήσεων διάστημα (Griffiths, 2013, Jian et.al, 2015). Εκτός από τις προαναφερθείσες ουσίες υπάρχουν και άλλες, όπως οι κυτοκερατίνες, τα microsattellites, τα υαλουρονικό οξύ και υαλουρονιδάση, τα FDP κλπ, που προς το παρόν αξιολογούνται σε διάφορες μελέτες. Ειδικά η κυτοκερατίνη 19 ανιχνεύεται με την μέθοδο CYFRA 21-1, ενώ οι κυτοκερατίνες 8 και 18 ανιχνεύονται με το UBC. Και για τις δύο μεθόδους έχει αναφερθεί υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Τα αμέσως προσεχή χρόνια, όταν θα έχουν ολοκληρωθεί και άλλες μελέτες αξιολόγησής τους, είναι πιθανό ότι κάποιοι από τους δείκτες αυτούς θα παίξουν ένα σημαντικό ρόλο στη διάγνωση και παρακολούθηση του καρκινώματος της ουροδόχου κύστεως. Προς το παρόν όμως η κυστεοσκόπηση παραμένει το gold standard για την παρακολούθηση του καρκίνου της κύστεως, αφού ο ιδανικός καρκινικός δείκτης δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμη ούτε και είναι βέβαιο ότι θα βρεθεί στο άμεσο μέλλον.

Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση περιλαμβάνει το σύνολο των διαγνωστικών τεχνικών με τις οποίες εκτιμάται τόσο η τοπική επέκταση ενός νεοπλάσματος όσο και η συστηματική διασπορά του. Αποτελεί αφ' ενός ένα κώδικα επικοινωνίας μεταξύ κλινικών και εργαστηριακών γιατρών, αφ' ετέρου μία επιστημονική ανάγκη, εφ' όσον η ακριβής σταδιοποίηση καθορίζει και την ιδανική θεραπεία.

Η σταδιοποίηση διακρίνεται σε κλινική και παθολογοανατομική. Στον καρκίνο της κύστεως το κλινικό στάδιο προκύπτει από το συνδυασμό φυσικής εξέτασης, απεικονιστικών τεχνικών, αμφίχειρης υπό νάρκωση εξέτασης και βιοψίας του όγκου. Η διουρηθρική εκτομή θεωρείται μέθοδος κλινικής σταδιοποίησης (Gartrell and Sporvade, 2013). Το παθολογοανατομικό (ή χειρουργικό) στάδιο προκύπτει μετά ακριβή καθορισμό των ανατομικών ορίων του όγκου μετά χειρουργική εξαίρεση. Να σημειωθεί ότι στην παθολογοανατομική σταδιοποίηση δεν περιλαμβάνεται αναγκαστικά και η ιστολογική εξέταση των λεμφαδενικών ή σπλαγγχνικών μεταστάσεων.

Ιδανική θα ήταν η σταδιοποίηση ενός νεοπλασματικού όγκου αν το κλινικό στάδιο συνέπιπτε με το παθολογοανατομικό. Αυτό είναι εξαιρετικά δύσκολο με τις υπάρχουσες τεχνικές γι' αυτό και δεν είναι σπάνια η υποσταδιοποίηση, η οποία σε όγκους χαμηλής ή μέσης διαφοροποίησης αναφέρεται μέχρι και 33 %. Η κλινική σταδιοποίηση, αν και συχνά παρέχει ανακριβή αποτελέσματα, είναι εκείνη η οποία καθορίζει το είδος της θεραπείας σε κάθε περίπτωση (συντηρητική ή χειρουργική).

7. Επέκταση των όγκων του ουροθηλίου

Τοπική επέκταση- Αγγειογένεση

Τα κύτταρα του φυσιολογικού ουροθηλίου συνδέονται τόσο μεταξύ τους όσο και με την υποκείμενη βασική μεμβράνη με ισχυρούς δεσμούς. Υπεύθυνα γι' αυτό είναι τα λεγόμενα «Μόρια Διακυττάριας Προσκόλλησης» (Intracellular Adhesion Molecules-ICAM), όπως η E-cadherin και η οικογένεια των ιντεγκρινών. Οι ουσίες αυτές φαίνεται ότι εμπλέκονται τόσο στη διακυττάρια επικοινωνία όσο και στην έκφραση και λειτουργία των υποδοχέων διαφόρων αυξητικών παραγόντων. Ταυτόχρονα αποτελούν

φραγμό στην επέκταση των όγκων του ουροθηλίου και τη διήθηση των υποκειμένων στρωμάτων. Μεταβολή της έκφρασης των ICAM δεν είναι σπάνια κατά την ανάπτυξη όγκων. Στην ουροδόχο κύστη πχ, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της E-cadherin σε διηθητικούς όγκους, καθώς επίσης και υπερέκφραση της ντεγκρίνης αββ4, από όλα τα κυτταρικά στρώματα του ουροθηλίου (Carballido and Rosenberg, 2014). Φαίνεται ότι κατά τη διαδικασία επέκτασης των όγκων διαταράσσεται η λειτουργία των ICAM και διευκολύνεται η διήθηση του στρώματος.

Η τοπική επέκταση ενός όγκου διευκολύνεται από μία ποικιλία βιολογικών μηχανισμών, όπως η αγγειογένεση, η λύση του στρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα, η αύξηση της κυτταρικής κινητικότητας και πολλαπλασιασμού καθώς και η διαφυγή από τους τοπικούς μηχανισμούς ανοσίας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες αγγειογένεση, δημιουργία δηλ. νέων αγγείων, παρατηρείται σπάνια και μόνο σε ιδιαίτερες περιπτώσεις (επούλωση τραυμάτων, κυκλικές αλλαγές ενδομητρίου, πλακούντας). Η διαδικασία προάγεται από ειδικά αγγειογενετικά μόρια που εκκρίνονται τόσο από τον ίδιο τον όγκο, όσο και από διάφορα μαστοκύτταρα ή μακροφάγα που τον διηθούν και τα οποία έλκονται χημειοτακτικά. Αγγειογενετικοί παράγοντες μπορεί επίσης να απελευθερώνονται και από το εξωκυττάριο στρώμα. Τέτοιοι παράγοντες είναι VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο bFGF, ο aFGF, ο PDECGF (Platelet derived endothelial cell growth factor), ο TNF α , ο Placental growth factor, ο EGF κλπ. Υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων τα γειτονικά αγγεία διατείνονται ενώ τα κύτταρα του ενδοθηλίου τους μεταναστεύουν προς το αγγειογενετικό ερέθισμα. Η μετακίνηση διευκολύνεται τόσο από την καταστροφή της βασικής τους μεμβράνης, όσο και από τη λύση του γειτονικού στρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία παράγονται από τους ινοβλάστες (όπως η κολλαγενάση τύπου IV). Ακολουθεί πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και διαμόρφωση νέων τριχοειδών (Carballido and Rosenberg, 2014, Leow et.al, 2014).

Από τους μέχρι τώρα αναγνωρισθέντες αγγειογενετικούς παράγοντες έχουν μελετηθεί επαρκώς οι VEGF, aFGF, bFGF και PDECGF. Ο VEGF προκαλεί πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (στη θέση αυτή ανιχνεύεται και ο υποδοχέας του). Ο bFGF είναι ο ισχυρότερος αγγειογενετικός παράγοντας που έχει αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα, βρίσκεται δε συνδεδεμένος με τις θεϊκές ηπαράνες του εξωκυτταρίου στρώματος και απελευθερώνεται υπό την επίδραση διαφόρων ηπαρινασών ή πρωτεασών. Ο PDECGF, που είναι ένα ένζυμο ομόλογο της φωσφορυλάσης της θυμιδίνης, έχει αναγνωρισθεί σε πολλούς ιστούς, αλλά ο μηχανισμός δράσης του παραμένει εν πολλοίς άγνωστος.

Πρόσφατες μελετες για τη συμβολή των αγγειογενετικών παραγόντων στον καρκίνο της κύστεως έδειξαν ότι η έκφραση του VEGF σε επιφανειακούς όγκους είναι 4πλάσια απ' αυτή σε διηθητικούς και 10πλάσια απ' ότι στη φυσιολογική κύστη. Αντίθετα η έκφραση του PDECGF σε διηθητικούς όγκους είναι 30 φορές μεγαλύτερη απ' ότι σε επιφανειακούς όγκους και 260 φορές μεγαλύτερη απ' ότι στη φυσιολογική κύστη (Serrano et.al, 2012). Αυτό δείχνει ότι πιθανόν να υπάρχουν διαφορετικοί αγγειογενετικοί δρόμοι στον επιφανειακό και διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Εξ άλλου το ποσό των a και bFGF έχει βρεθεί σημαντικά αυξημένο στα ούρα ασθενών με Ca κύστεως

Η καλύτερη κατανόηση της αγγειογένεσης θέτει τις βάσεις για την εφαρμογή της αντι-αγγειογένεσης στη θεραπεία του καρκίνου. Πράγματι παρεμβαίνοντας σε διάφορα επίπεδα της αγγειογενετικής διαδικασίας είναι δυνατόν να αναστείλουμε την επέκταση ενός όγκου. Το ίδιο μπορεί να επιτευχθεί και με τη χορήγηση ουσιών που είναι γνωστοί αναστολείς της αγγειογένεσης, όπως η αγγειοστατίνη και η θρομβοσπονδίνη (Serrano et.al, 2012).

Η τοπική επέκταση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, στο 60% των περιπτώσεων, γίνεται προς τον υποκείμενο μυ, παρ' όλο που υπάρχουν και μορφές

πλάγιας επέκτασης. Όγκος που αναπτύσσεται σε εκκόλπωμα μπορεί να διηθήσει κατευθείαν γειτονικά όργανα, αφού το εκκόλπωμα στερείται μυϊκού τοιχώματος, γι' αυτό και στις περιπτώσεις αυτές ενδείκνυται μερική κυστεκτομή.

Λεμφογενής διασπορά

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως μεθίσταται λεμφογενώς στους επιχώριους λεμφαδένες της πυέλου (έσω και έξω λαγόνιοι, κοινοί λαγόνιοι, θυροειδείς, προϊεροί). Η λεμφογενής διασπορά είναι ανεξάρτητη από την αιματογενή.

Αιματογενής διασπορά

Θεωρητικά ο καρκίνος της κύστεως μπορεί να επεκταθεί αιματογενώς σε οποιοδήποτε όργανο. Στην πράξη μεθίσταται κυρίως στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στα οστά και στα επινεφρίδια, ενώ σπανιότερα μεθίσταται στον εγκέφαλο.

Η ύπαρξη αιματογενών ή λεμφογενών μεταστάσεων κατά τη στιγμή της διάγνωσης, επιβαρύνει ουσιωδώς την πρόγνωση.

Εμφύτευση

Το καρκίνωμα της κύστεως θεωρείται ότι έχει την τάση να εμφυτεύεται σε τραχείες επιφάνειες, όπως κοιλιακά τραύματα ή γειτονικές θέσεις του ουροθηλίου που έχουν υποστεί λύση της συνεχείας (πχ από τη χρήση του ρεζεκτοσκοπίου). Αν και παλαιότερες μελέτες αμφισβήτησαν αυτή τη δυνατότητα, εν τούτοις η σύγχρονη τάση είναι να λαμβάνονται προφυλακτικά μέτρα ώστε να αποφεύγεται η διασπορά. Προς το σκοπό αυτό πολλοί συνιστούν την χορήγηση χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας πριν τη μερική ή ολική κυστεκτομή. Προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη της EORTC έδειξε ότι η εφ' άπαξ ενδοκυστική έγχυση 80 mg επιρουμπικίνης κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο, μπορεί να μειώσει περίπου στο μισό το ρυθμό υποτροπής της νόσου (140). Ένας από τους μηχανισμούς μπορεί να είναι ο αποκλεισμός της εμφύτευσης υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων στις θέσεις του τραυματισμένου επιθηλίου.

8. Απεικονιστικές τεχνικές

Αξονική τομογραφία

Η αξονική τομογραφία χρησιμοποιείται τόσο για την εκτίμηση της τοπικής επέκτασης της νόσου, όσο και για την ανίχνευση πιθανών μεταστάσεων. Στην πρώτη περίπτωση η CT θα πρέπει να γίνεται πριν την TUR, οπότε είναι πιθανό να αποκαλύψει πάχυνση του τοιχώματος ή/και ασάφεια του περικυστικού λίπους, ένδειξη εξωκυστικής επέκτασης της νόσου. Παρ' όλα αυτά η διαγνωστική της ακρίβεια είναι περιορισμένη επειδή αδυνατεί να ανιχνεύσει τυχόν μικροσκοπική εξωκυστική επέκταση, ή να διαφοροδιαγνώσει με ακρίβεια τους επιφανειακούς από τους διηθητικούς όγκους (Zlatev et.al, 2015). Διηθημένοι λεμφαδένες ανιχνεύονται με CT μόνο όταν το μεγεθός τους είναι μεγαλύτερο από 1 cm, ενώ ηπατικές μεταστάσεις ανιχνεύονται μόνο όταν έχουν μέγεθος μικρότερο από 2 cm

Μαγνητική τομογραφία

Αν και υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι η εξέταση αυτή έχει μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία από την CT, εν τούτοις στην καθημερινή κλινική πράξη δεν φαίνεται να είναι χρησιμότερη απ' αυτή. Εξαιρέση ίσως αποτελούν οι οστικές μεταστάσεις οι οποίες ανιχνεύονται καλύτερα με MRI.

Σπινθηρογράφημα οστών

Συνήθως δεν χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση μεταστάσεων του καρκίνου της κύστεως, εκτός αν ο ασθενής είναι συμπτωματικός ή η αλκαλική φωσφατάση του ορού είναι αυξημένη (Zlatev et;al, 2015).

Υπερηχογράφημα

Ενώ ο ρόλος του υπερηχογραφήματος στη διάγνωση του Ca κύστεως είναι πολύ σημαντικός, στη σταδιοποίηση της νόσου φαίνεται ότι έχει ελάχιστη αξία. Σε πρόσφατη μελέτη το διουρηθρικό υπερηχογράφημα αποδείχθηκε χρήσιμο στο διαχωρισμό επιφανειακών από διηθητικούς όγκους, στον υπολογισμό του βάθους διείσδυσης καθώς και στην ανακάλυψη τυχόν εξωκυστικής επέκτασης της νόσου (Zlatev.al, 2015). Παρ' όλα αυτά η μέθοδος αυτή δεν έχει γίνει ευρέως αποδεκτή.

9. Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η πλειονότητα των ασθενών με επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης αντιμετωπίζεται επαρκώς με διουρηθρική εκτομή του όγκου. Τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης φθάνουν το 70%. Οι περισσότεροι ασθενείς που καταλήγουν δεν έχουν σαν αιτία τον καρκίνο της κύστης Η συχνότητα εξέλιξης του επιφανειακού σε διηθητικό όγκο είναι μικρή σε ασθενείς που αρχικά έχουν όγκο καλώς και μέτρια διαφοροποιημένο που περιορίζεται στο βλεννογόνο, ενώ είναι αρκετά μεγάλη (46%) σε ασθενείς με αρχικό όγκο που προσβάλλει τη βασική μεμβράνη και εμφανίζει χαμηλή διαφοροποίηση. Έχουν εφαρμοσθεί διάφορες θεραπείες σαν επικουρικές σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης για την πρόληψη των υποτροπών και της εξέλιξης σε διηθητικό. Σε αυτές περιλαμβάνονται: ηνδοκυστική χημειοθεραπεία, η συστηματική χημειοθεραπεία, ενδοκυστική ανοσοθεραπεία με ιντερφερόνη, BCG, η ανοσοθεραπεία από το στόμα με παράγοντες όπως η βρωμιραμίνη και η ενδοκυστική βιολογική θεραπεία με παράγοντες όπως ο TP40, ένα συνθετικό σύμπλεγμα TGF-α και εξωτοξίνης της ψευδομονάδας, που δεν εφαρμόζεται πλέον σε ευρεία βάση (Sun and Trihn, 2015). Η ιδεώδης παρακολούθηση των ασθενών με επιφανειακό όγκο της ουροδόχου κύστης μετά από διουρηθρική εκτομή και θεραπεία είναι η κυστεοσκόπηση και οι κυτταρολογικές εξετάσεις κάθε 3 μήνες, για 18-24 μήνες μετά τον αρχικό όγκο, κάθε 6 μήνες για τα επόμενα 2 χρόνια και ακολούθως μία φορά το χρόνο

Η θεραπεία των όγκων που διηθούν το μυϊκό χιτώνα της κύστης περιλαμβάνει τη ριζική κυστεκτομή σαν αρχική θεραπεία και την ανακατασκευή της κύστης με εκτροπή των ούρων και νεοκύστη και συμπληρωματικά χημειοθεραπεία σε ασθενείς με παθολογοανατομικά ευρήματα που υποδηλώνουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής. Η ριζική κυστεκτομή, η πιο αποτελεσματική τοπική θεραπεία για ασθενείς με καρκίνο της κύστης, συνοδεύεται με τοπική υποτροπή στην ελάσσονα πύελο, σε ποσοστά 10-30%, ενώ η ακτινοβολία εμφανίζει υποτροπή σε ποσοστά 50-70%.(Κωστακόπουλος 2013). Εναλλακτικά της ριζικής κυστεκτομής θεραπευτική επιλογή αποτελεί η ακτινοβολία, ιδιαίτερα σε ασθενείς που δεν μπορούν να χειρουργηθούν λόγω συνυπαρχόντων χρονίων νοσημάτων Η ακτινοβολία για καρκίνο της κύστης περιλαμβάνει συνολική δόση 70Gy για διάστημα επτά εβδομάδων (35 συνεδρίες) με 50 Gy στην ελάσσονα πύελο. Δεν έχει αποδειχθεί πως η ακτινοβολία της ελάσσονος πύελου ελέγχει τις λεμφαδενικές μεταστάσεις. Δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του Grade του όγκου και της ανταπόκρισης στην ακτινοθεραπεία, αν και οι κακώς διαφοροποιημένοι όγκοι εμφανίζονται σε πιο προχωρημένο στάδιο και έχουν χειρότερη πρόγνωση. Σε ποσοστό 50-70% παρουσιάζονται υποτροπή μετά την ακτινοθεραπεία

Σε περίπτωση μεταστατικής νόσου χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, η cis-πλατίνα, η βινβλαστίνη, η μεθοτρεξάτη και η δοξορουβικίνη εμφανίζουν αποτελεσματικότητα

κατά του καρκίνου από μεταβατικό επιθήλιο. Ο συνδυασμός των πιο πάνω χημειοθεραπευτικών έχει εκτιμηθεί σε διάφορες κλινικές μελέτες. Ο συνδυασμός και των τεσσάρων φαρμάκων (MVAC) εμφανίζει αντικειμενική ανταπόκριση σε ποσοστά 57-70%. Παρόλα αυτά η διετής επιβίωση που επιτυγχάνεται αφορά μόνο το 20% των ασθενών. Η τοξικότητα του σχήματος επίσης είναι αρκετά ισχυρή και μπορεί η θνησιμότητα να φθάσει το 23% συνήθως λόγω σήψης ή συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και έμφρακτου του μυοκαρδίου.

10. Κλινική πορεία και προγνωστικοί παράγοντες

Κλινική πορεία

Οι πρωτοεμφανιζόμενοι όγκοι της ουροδόχου κύστεως είναι επιφανειακοί σε ποσοστό 50-70%. Οι υπόλοιποι εμφανίζονται εξ αρχής ως διηθητικοί, με το 50% απ' αυτούς να έχει ήδη δώσει λανθάνουσες μεταστάσεις οι οποίες θα γίνουν εμφανείς σε διάστημα ενός έτους από τη διάγνωση (Jian et.al, 2015). Από τους ασθενείς με διηθητικό όγκο το 80% έχει προηγούμενο ιστορικό ελεύθερο για καρκίνο της κύστεως (Jian et.al, 2015) Όσον αφορά το βαθμό διαφοροποίησης, το 60-65% των πρωτοεμφανιζόμενων όγκων είναι grade I και II, ενώ το υπόλοιπο είναι grade III.

Σημαντικό και εν πολλοίς δυσεπίλυτο πρόβλημα των επιφανειακών όγκων είναι οι υποτροπές. Υπολογίζεται ότι το 40-80% των όγκων αυτών υποτροπιάζουν μετά την TURT (Griffiths, 2013). Οι πλείστες των υποτροπών φαίνεται ότι παριστούν νέους όγκους, αν και δεν είναι σπάνια η επανεμφάνιση ενός όγκου στην ίδια θέση εξ αιτίας ανεπαρκούς εξαίρεσης. Οι υποτροπές, όπως είναι ευνόητο, επιβαρύνουν τον ασθενή με ουσιώδη νοσηρότητα. Η υποτροπή ενός όγκου γίνεται συνήθως τους πρώτους 12 μήνες μετά την TURT, ενώ οι ασθενείς με όγκους που υποτροπίασαν μία φορά έχουν αυξημένο κίνδυνο και άλλης υποτροπής. Γενικά ο ρυθμός υποτροπής, όπως άλλωστε και ο ρυθμός εξέλιξης) επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως μέγεθος και μορφή του όγκου, το grade κλπ. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μικρότεροι όγκοι έχουν μικρότερο ρυθμό υποτροπής και εξέλιξης, αν και υπάρχουν μελέτες που καταλήγουν σε διαφορετικό συμπέρασμα. Εξ' άλλου οι T1 και οι highgrade όγκοι υποτροπιάζουν πολύ συχνότερα, ενώ η συνύπαρξη δυσπλασίας ή CIS, εκτός από το ότι είναι δυσμενής παράγοντας για εξέλιξη ενός όγκου σε διηθητικό, ανεβάζει και το ποσοστό υποτροπής από 43 σε 73%. Η ενδοκυστική χορήγηση διαφόρων χημειο- και ανοσοθεραπευτικών παραγόντων μειώνει το ρυθμό υποτροπής των επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστεως.

Αν και όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο οι γενετικοί και αγγειογενετικοί δρόμοι ανάπτυξης των επιφανειακών και διηθητικών όγκων είναι διαφορετικοί, εν τούτοις οι πρώτοι έχουν τη δυνατότητα να εξελιχθούν και να διηθήσουν τη μυική στιβάδα. Περίπου το 10% των T_a και το 2-38% των T1 όγκων εξελίσσονται σε διηθητικούς (Κωστακόπουλος 2003). Χαρακτηριστική είναι η σημαντική διακύμανση στο ποσοστό των T1, σε διάφορες σειρές, γεγονός που προφανώς οφείλεται στο ότι οι όγκοι αυτοί παριστούν ετερογενή ομάδα.

Η επιβίωση των ασθενών με Ca κύστεως σχετίζεται άμεσα με το στάδιο και είναι βέβαια μικρότερη στους όγκους T4 (25%), T3 (39%) και T2 (53%) σε σύγκριση με τους επιφανειακούς (81%).

Προγνωστικοί παράγοντες

Η εξέλιξη ενός επιφανειακού καρκινώματος σε διηθητικό καθορίζεται από μία σειρά προγνωστικών παραγόντων οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι οι εξής:

Grade

Όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης (υψηλού grade) εξελίσσονται σε διηθητικούς σε μεγαλύτερο ποσοστό από τους μέτρια και καλά διαφοροποιημένους. Τα ποσοστά που

αναφέρονται σε διάφορες σειρές για τους grade I, II και III είναι 10-20%, 19-37% και 33-64% αντίστοιχα.

Βάθος διήθησης

Η διήθηση της υποβλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας (muscularis mucosa) αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Οι Younes et al διέκριναν τους επιφανειακούς όγκους σε T1a (μη διήθηση της υποβλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας), T1b (διήθηση μέχρι το επίπεδο της υποβλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας) και T1c (διήθηση πέρα από το επίπεδο αυτό) και έδειξαν ότι η επιβίωση είναι σημαντικά μικρότερη στους T1c όγκους (11%) σε σύγκριση με τους T1a και T1b (75%).

Συνύπαρξη CIS

Πλήθος μελετών έχει δείξει ότι τυχόν συνοδός δυσπλασία ή CIS αυξάνει το ποσοστό εξέλιξης ενός επιφανειακού καρκίνου σε διηθητικό. Η διάχυτη μορφή του CIS συμπεριφέρεται πιο επιθετικά από την εστιακή (67). Ασθενείς με διάχυτο CIS και ερεθιστικά συμπτώματα αναπτύσσουν διηθητικό όγκο συχνότερα απ' αυτούς στους οποίους τα συμπτώματα αυτά ελλείπουν (Κωστακόπουλος, 2003).

Αριθμός και μέγεθος

Η ύπαρξη πολλαπλών όγκων σχετίζεται κυρίως με αυξημένο ρυθμό υποτροπών (Κωστακόπουλος, 2003), αλλά σύμφωνα με μερικούς ερευνητές και με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου (Leow et.al, 2014). Οσον αφορά το μέγεθος διάφορες μελέτες έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η γενική εντύπωση πάντως είναι ότι οι μικρότεροι όγκοι έχουν χαμηλότερο ρυθμό εξέλιξης σε διηθητική νόσο.

Διήθηση αγγείων και λεμφαγγείων

Οι επιφανειακοί όγκοι διηθούν τα αγγεία σε μικρό ποσοστό (2,5-7%) (92). Ειδικά η διήθηση των λεμφαγγείων αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα εξέλιξης της νόσου (Sonpavde et.al, 2015).

Απώλεια των αντιγόνων ABH

Η ομάδα των αντιγόνων ABH περιλαμβάνει αντιγόνα τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα με γλυκοπρωτείνες ή γλυκολιπίδια στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων και σε διάφορα επιθηλιακά κύτταρα, μεταξύ των οποίων κι αυτά του ουροθηλίου. Έχει βρεθεί ότι η απώλεια της έκφρασης των αντιγόνων ABH από τους όγκους του ουροθηλίου είναι προγνωστικός παράγοντας επιθετικής συμπεριφοράς και διήθησης (Orntoft, 1990)). Επιφανειακοί όγκοι που διατηρούν τα αντιγόνα αυτά έχουν μικρότερη πιθανότητα μετατροπής σε διηθητικούς, ενώ αντίθετα η μείωση των επιπέδων των αντιγόνων σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα οδηγεί σε ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου σε ποσοστό 62-66%.

T (Thomsen- Friedenreich) αντιγόνο

Το αντιγόνο αυτό θεωρείται πρόδρομη μορφή άλλων. Σε φυσιολογικά κύτταρα είναι “κρυπτικό” και μπορεί να αποκαλυφθεί με τη νευραμινιδάση, ενώ αντίθετα στα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζεται με μία μη κρυπτική μορφή και η έκφρασή του έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με διηθητική νόσο και πτωχή πρόγνωση.

Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Μέτρο της πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας των κυττάρων αποτελεί η έκφραση ορισμένων πυρηνικών αντιγόνων η οποία αυξάνεται όταν υπάρχει έντονη σύνθεση DNA (και κατ' επέκταση ταχεία αναπαραγωγή), γεγονός συχνό στα κακοήθη

νεοπλασματικά κύτταρα. Ογκοί στους οποίους η έκφραση αυτών των πυρηνικών αντιγόνων είναι αυξημένη συμπεριφέρονται επιθετικότερα, στη δε ουροδόχο κύστη έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα μετατροπής σε διηθητικούς. Τέτοια αντιγόνα είναι το PCNA (proliferatingcellnuclearantigen) και το Ki 67, αυξημένη έκφραση των οποίων έχει συσχετισθεί με αυξημένη επιθετικότητα και χειρότερη πρόγνωση στο Ca κύστεως (Matsushita et.al, 2011).

11. Θεραπεία του επιφανειακού Ca κύστεως

Διουρηθρική εκτομή (TURBT)

Η διουρηθρική εκτομή αποτελεί την αρχική αντιμετώπιση οποιουδήποτε όγκου της ουροδόχου κύστεως, στην περίπτωση δε επιφανειακού όγκου ίσως και τη μοναδική. Η τεχνική της διουρηθρικής εκτομής πρέπει να ακολουθεί συγκεκριμένους κανόνες για την αποφυγή επιπλοκών, η δε χρήση της video-ενδοσκόπησης όχι μόνο διευκολύνει κατά πολύ την εκτομή όγκων που εντοπίζονται σε δύσκολες θέσεις, αλλά προστατεύει και το χειρουργό από την επαφή με υγρά του ασθενούς, ενώ ταυτόχρονα παρέχει τη δυνατότητα εκπαίδευσης. Στο υλικό της διουρηθρικής εκτομής θα πρέπει να περιλαμβάνεται και μυϊκός ιστός, ώστε να καθοριστεί με ακρίβεια το στάδιο του όγκου. Πολλές φορές, ιδίως αν υπάρχει υπόνοια CIS, η TURBT μπορεί να συνδυαστεί με τυχαίες βιοψίες κύστεως. Εξ άλλου διάφοροι συγγραφείς συνιστούν τη λήψη βιοψιών, με το ρεζεκτοσκόπιο, από την προστατική ουρήθρα, ιδίως αν σε προηγηθείσα κυτταρολογική ούρων έχουν ανιχνευθεί κύτταρα ενδεικτικά highgrade όγκου (El-Abbadly. 2002).

Η υπό νάρκωση αμφίχειρη εξέταση πριν και μετά την TURBT είναι δυνατόν να αποκαλύψει υπολλειματική νόσο (ανεπαρκής εκτομή επιφανειακού όγκου ή διήθηση της μυϊκής στιβάδας).

Τη διουρηθρική εκτομή ενός επιφανειακού όγκου της ουροδόχου κύστεως μπορεί να ακολουθήσει η ενδοκυστική έγχυση διαφόρων χημειοθεραπευτικών και ανοσοθεραπευτικών παραγόντων, όπως αναλύεται και πιο κάτω.

Laser

Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι Laser στην χειρουργική των όγκων της κύστεως. Πιο εύχρηστο θεωρείται το Nd: YAGlaser, που έχει μήκος κύματος 1064 nm, η δε εφαρμογή του προκαλεί εν τω βάθει θερμική νέκρωση. Πλεονεκτήματα των laser σε σύγκριση με την TURBT θεωρούνται η μικρότερη αιμορραγία, η δυνατότητα χρήσης τους με τοπική αναισθησία και με εύκαμπτο κυστεοσκόπιο, η πολύ μικρή πιθανότητα διάτρησης της κύστεως, ο σπάνιος ερεθισμός του θυροειδούς νεύρου, η μη απαραίτητη χρήση καθετήρα Foley μετεγχειρητικά και η αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση όγκου μέσα σε εκκόλπωμα. Μειονέκτημα θεωρείται κυρίως το γεγονός ότι δεν παρέχουν επαρκή ιστό για σταδιοποίηση. Επιπροσθέτως η διάτρηση του εντέρου, χωρίς ταυτόχρονη διάτρηση της κύστεως, αποτελεί μοναδική (αν και σπάνια) επιπλοκή των laser (El-Abbadly. 2002)..

Κυστεκτομή

Ριζική κυστεκτομή γενικά δεν ενδείκνυται στον επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Εξαιρέση στον κανόνα αυτό αποτελούν οι περιπτώσεις πολλαπλών, συμπτωματικών όγκων που είναι αδύνατον να εξαιρεθούν διουρηθρικός, καθώς και το CIS όταν αποτύχει η συντηρητική θεραπεία με BCG.

Ενδοκυστική θεραπεία

Η ενδοκυστική χορήγηση διαφόρων χημειοθεραπευτικών και ανοσοθεραπευτικών παραγόντων, αν και πρωτοπεριγράφηκε το 1903, έγινε δημοφιλής τη δεκαετία του

1980, έλαβε δε μεγάλες διαστάσεις τη δεκαετία του 1990 (Griffiths, 2013). Η μετεγχειρητική ενδοκυστική θεραπεία χορηγείται για τους εξής λόγους:

α) Προφυλακτικώς, μετά από μία φαινομενικά πλήρη διουρηθρική εκτομή ενός όγκου, με σκοπό την πρόληψη υποτροπής. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ποσοστό υποτροπής ενός επιφανειακού όγκου ο οποίος αντιμετωπίζεται μόνο με TURT κυμαίνεται από 40-80%.

β) Θεραπευτικώς, μετά από μία ατελή διουρηθρική εκτομή, με σκοπό την αντιμετώπιση του υπολειπόμενου όγκου ή τυχόν συνυπάρχοντος CIS.

γ) Συμπληρωματικώς, μετά μία φαινομενικά πλήρη TURT, για την πρόληψη υποτροπής με το μηχανισμό της εμφύτευσης εναπομεινάντων νεοπλασματικών κυττάρων. Προς το σκοπό αυτό χορηγείται κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο μία εφ' άπαξ δόση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα.

δ) Για την πρόληψη της διήθησης της μυϊκής στιβάδας. Προς το παρόν μόνο η ενδοκυστική χορήγηση BCG έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το ρυθμό μετατροπής ενός επιφανειακού όγκου σε διηθητικό.

Επί του παρόντος, κανείς από τους παράγοντες που χρησιμοποιούνται για ενδοκυστικές εγχύσεις δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ιδανικός. Ιδανικό για ενδοκυστικές εγχύσεις θα ήταν ένα φάρμακο το οποίο, με εφ' άπαξ χορήγηση, θα παρείχε απόλυτη προστασία τόσο από τις υποτροπές όσο και από την εξέλιξη του όγκου σε διηθητικό, ενώ ταυτόχρονα θα είχε χαμηλή τοξικότητα αλλά και χαμηλό κόστος (Griffiths, 2013). Από την άλλη μεριά δεν έχει καθοριστεί ακόμη ένα ιδανικό σχήμα χορήγησης τόσο των χημειοθεραπευτικών, όσο και των ανοσοθεραπευτικών παραγόντων. Γεγονός όμως είναι ότι για την αποτελεσματική δράση των φαρμάκων αυτών είναι απαραίτητη η επαφή τους με το μη φυσιολογικό επιθήλιο, έτσι ώστε να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Εξυπακούεται ότι το φάρμακο για να δράσει θα πρέπει να βρίσκεται σε ικανοποιητική συγκέντρωση μέσα στην ουροδόχο κύστη, γι' αυτό και είναι απαραίτητο οι ασθενείς να αποφεύγουν τη λήψη υπερβολικών ποσοτήτων υγρών πριν την έγχυση και η κύστη να κενώνεται από τυχόν ποσότητα ούρων.

Ενδοκυστική χημειοθεραπεία

Παράγοντες που χορηγούνται ενδοκυστικώς στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι (Jordan and Iyre, 2015):

α) Thiotepa: Είναι το παλαιότερο από τα φάρμακα του είδους. Ανήκει στους αλκυλιούντες παράγοντες και δρα αναστέλλοντας την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και κατ' επέκταση την πρωτεϊνοσύνθεση. Οι συνήθεις δόσεις είναι 30 mg σε 30ml ή 60 mg σε 60 ml. Όταν το φάρμακο χρησιμοποιείται για θεραπεία υπολειπόμενου όγκου προκαλεί πλήρη ανταπόκριση στο 38% των περιπτώσεων (Premo et.al, 2015). Το φάρμακο προκαλεί καταστολή του μυελού των οστών, γεγονός που οφείλεται στο χαμηλό μοριακό του βάρος (189 Da). Έχει βρεθεί ότι το 1/3 της χορηγούμενης ενδοκυστικά δόσης απορροφάται και εισέρχεται στην κυκλοφορία. Η μυελοκαταστολή μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή της λευκοπενίας (8-54%) ή θρομβοπενίας (3-31%) (. Η Thiotepa δεν είναι αποτελεσματική στο CIS.

β) Ethoglucid: Ο μηχανισμός δράσης του παράγοντα αυτού δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Επειδή έχει μοριακό βάρος 262 Da δεν απορροφάται και δεν προκαλεί μυελοκαταστολή. Όταν χρησιμοποιείται για θεραπεία προκαλεί πλήρη ανταπόκριση στο 42% των περιπτώσεων (Premo et.al, 2015). Έχουν αναφερθεί παρενέργειες τόσο τοπικές (χημική κυστίτις), όσο και συστηματικές, αλλά αυτές συνήθως είναι ήπιες και παροδικές.

γ) Αδριαμυκίνη (Doxorubicin): Είναι αντιβιοτικό ιδιαίτερα τοξικό στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Έχει υψηλό μοριακό βάρος (580 Da), γι' αυτό και δεν απορροφάται συστηματικά. Η χρησιμοποιούμενη δόση κυμαίνεται από 30-100 mg. Η

αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στη θεραπεία υπολλειπομένου όγκου, είναι περίπου 38% (Jani et.al, 2015). Η χρήση της αδριαμυκίνης για προφύλαξη έναντι των υποτροπών δεν φαίνεται να προσφέρει κανένα σημαντικό πλεονέκτημα. Χημική κυστίτις αναφέρεται στο 25% των περιπτώσεων.

δ) Epirubicin: Είναι παράγωγο της αδριαμυκίνης με μικρότερη τοξικότητα. Χημική κυστίτις αναφέρεται σε ποσοστό 6,8-14% (Jani et.al, 2015). Η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, όταν χορηγηθεί εφ' άπαξ ενδοκυστικώς στην άμεση μετεγχειρητική περίοδο, αξιολογήθηκε σε μία μελέτη της EORTC (Bellmunt et.al, 2009). Σ' αυτή βρέθηκε ότι 80 mg επιρουμπικίνης, όταν χορηγούνται με τον τρόπο αυτό, μειώνουν το ρυθμό υποτροπής της νόσου σχεδόν κατά 50%. Είναι πιθανόν ότι η επιρουμπικίνη δρα εναντίον μη εμφανούς υπολλειπομένου όγκου αλλά και αποτρέποντας την εμφύτευση καρκινικών κυττάρων. Στην ίδια μελέτη δείχθηκε ότι το φάρμακο αυτό δεν επηρεάζει την εξέλιξη ενός όγκου σε διηθητικό, ούτε την επιβίωση.

ε) Mitoxantrone: Είναι ένας συνθετικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας με δομή και λειτουργία παρόμοια της δοξορουβικίνης. Έχει χορηγηθεί προφυλακτικώς μετά διουρηθρική εκτομή όγκων T_a και T₁, σε δόσεις που κυμαίνονται από 5- 20 mg (169-171). Η αποτελεσματικότητά της είναι περίπου 63% (170). Γενικά η μιτοξανδρόνη είναι καλά ανεκτή με δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα (Lucca et.al, 2105).

στ) MitomycinC: Ανήκει στα αντιβιοτικά και δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA. Έχει μοριακό βάρος 334 Da γι' αυτό και δεν αποροφάται συστηματικά. Οι συνήθως χρησιμοποιούμενες δόσεις είναι 20-60 mg. Ο μηχανισμός δράσης, η αποτελεσματικότητα και οι επιπλοκές του φαρμάκου αυτού αναλύονται σε ειδικό κεφάλαιο.

Ενδοκυστική ανοσοθεραπεία

Περιλαμβάνει τη ενδοκυστική χορήγηση διαφόρων παραγόντων οι οποίοι ονομάζονται τροποποιητές της βιολογικής απάντησης (biologic response modifiers). Αυτοί έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν αλλαγές στην τοπική ανοσολογική απάντηση του οργανισμού απέναντι στο TCC. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών που διηθούν ένα όγκο, αύξηση στην έκφραση διαφόρων κυτοκινών ή άλλων παραγόντων κλπ. με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων.

α) BCG: Αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη *Mycobacterium bovis*, η δε ενδοκυστική χορήγησή του αποτελεί μία μορφή της ονομαζόμενης “ενεργητικής μη ειδικής ανοσοθεραπείας”. Το BCG προκαλεί αύξηση της ανοσολογικής απάντησης απέναντι σ' ένα όγκο της ουροδόχου κύστεως με μηχανισμό ο οποίος δεν έχει γίνει απόλυτα κατανοητός. Η αποτελεσματικότητά του έχει αποδειχθεί ανώτερη όλων των άλλων χημειο- και ανοσοθεραπευτικών παραγόντων. Το BCG αναλύεται εκτενώς σε ειδικό κεφάλαιο.

β) Ιντερφερόνες: Είναι ουσίες με αντινεοπλασματικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες, οι οποίες εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού ως αποτέλεσμα διαφόρων ερεθισμάτων. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωρισθεί 3 κλάσεις ιντερφερονών οι IFN_α, IFN_β και IFN_γ. Η IFN_α παράγεται κυρίως από τα λευκοκύτταρα, η IFN_β από τους ινοβλάστες ενώ η IFN_γ από τα T λεμφοκύτταρα. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί επαρκώς η IFN_α. Η ουσία αυτή, εκτός από το ότι προκαλεί μείωση του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων, φαίνεται ότι διεγείρει τα NK (natural killer) κύτταρα και αυξάνει την έκφραση των αντιγόνων MHC στα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που διευκολύνει την καταστροφή τους. Στη θεραπεία υπολλειπομένου όγκου η IFN_α προκαλεί πλήρη ανταπόκριση στο 25% των περιπτώσεων (Williams et.al, 2010). Η προφυλακτική χορήγηση IFN_α μετά πλήρη εκτομή ενός όγκου δεν είναι τόσο αποτελεσματική σε σύγκριση μ' αυτή του BCG, η τοξικότητά της όμως είναι σαφώς

μικρότερη. Η IFNα μπορεί να προκαλέσει γριπποειδή συνδρομή σε ποσοστό 17% περίπου.

Η αποτελεσματικότητα της IFNγ προς το παρόν ερευνάται σε διάφορες μελέτες.

γ) **Ιντερλευκίνες:** Ανήκουν (όπως και οι ιντερφερόνες) στις λεμφοκίνες και θεωρούνται ουσίες με αντινεοπλασματική δράση. Έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά κυρίως στον καρκίνο του νεφρού αλλά και σε άλλους όγκους του ουρογεννητικού. Στον καρκίνο της κύστεως η εμπειρία είναι περιορισμένη. Έχει δειχθεί ότι η ενδοκυστική χορήγηση BCG αυξάνει το επίπεδο των εκκρινόμενων στα ούρα ιντερλευκινών κι αυτό είναι μία ένδειξη ότι οι ουσίες αυτές ίσως είναι μεσολαβητές της αντινεοπλασματικής δράσης του BCG. Απ' ευθείας ενδοκυστική έγχυση ιντερλευκινών βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό στάδιο.

δ) **Bropirimitine:** Είναι ουσία η οποία επηρεάζει την ανοσολογική απάντηση (biologic response modifier). Όπως έχει δειχθεί σε μοντέλα πειραματοζώων, (ενδείξεις για παρόμοια δράση υπάρχουν και στον άνθρωπο), η ουσία αυτή προάγει την έκκριση ιντερφερόνης, τροποποιεί την έκκριση άλλων λεμφοκινών και έχει αντιική και αντικαρκινική δραστηριότητα (Williams et.al, 2010). Η bropirimitine χορηγείται από το στόμα και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πρώτων ερευνών, είναι δραστική στο CIS της κύστεως αλλά και του ανώτερου ουροποιητικού. Σε κλινική μελέτη φάσεως II ο ρυθμός πλήρους υποστροφής (complete response) του CIS ήταν 56%. Το ευνοϊκό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε κυρίως μετά από θεραπεία 12 εβδομάδων, η δε διάρκειά του ξεπέρασε τους 12 μήνες κατά μέσο όρο (Williams et.al, 2010). Φαίνεται ότι η χορήγηση 3000 mg bropirimitine την ημέρα είναι αποτελεσματική ακόμη και σε ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στο BCG. Ως παρενέργειες του φαρμάκου αναφέρονται γριπποειδή συμπτώματα (πυρετός, κεφαλαλγία, ρίγος, μυαλγίες), αλλά και καρδιακή αρρυθμία. Επί του παρόντος βρίσκονται σε εξέλιξη δύο μελέτες της EORTC για την bropirimitine.

ε) **Άλλοι παράγοντες:** Εκτός από τις προαναφερθείσες ουσίες υπάρχουν και άλλες της ίδιας κατηγορίας που μελετώνται εντατικά και επομένως η αποτελεσματικότητά τους αναμένεται να καθορισθεί στο μέλλον. Τέτοιες ουσίες είναι ο Tumour Necrosis Factor-TNF (του οποίου αυξημένα επίπεδα στα ούρα παρατηρούνται μετά ενδοκυστικές εγχύσεις BCG), η Keyhole-Limpet Hemocyanin-KLH, η TP40 κλπ.

Θεραπεία του CIS

Ενώ μέχρι και τη δεκαετία του 1970 η κυστεκτομή αποτελούσε την αρχική και ίσως τη μοναδική αποτελεσματική θεραπεία της του CIS, η χρήση του BCG υπό τη μορφή ενδοκυστικών εγχύσεων άλλαξε την θεραπευτική προσέγγιση στην ιδιαίτερη αυτή μορφή TCC. Σε διάφορες σειρές η αποτελεσματικότητα του BCG στο CIS αναφέρεται περίπου 70% (39-100%), με άριστο ελεύθερο νόσου διάστημα (Garcia and Dreiser, 2006). Το BCG έχει αποδειχθεί αποτελεσματικότερο της δοξορουβικίνης στη θεραπεία του CIS. Μελέτη του SWOG (Southwest Oncology Group) έδειξε ότι η χορήγηση επιπλέον 3 εβδομαδιαίων εγχύσεων BCG, 3 μήνες μετά τις αρχικές 6, αυξάνει το ρυθμό πλήρους ανταπόκρισης από 70 σε 82%. Στην ίδια μελέτη στους πλήρως ανταποκριθέντες ασθενείς χορηγήθηκε προφυλακτική θεραπεία υπό τη μορφή 3 εβδομαδιαίων εγχύσεων κάθε 6 μήνες για συνολική περίοδο 3 ετών. Με το παραπάνω σχήμα περισσότερο από το 75% των ασθενών παρέμεινε ελεύθερο νόσου για τουλάχιστον 5 χρόνια.

Ασθενείς με CIS οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στην ενδοκυστική χορήγηση BCG είναι πιθανό να ανταποκριθούν σ' ένα δεύτερο κύκλο BCG, ή σε άλλης μορφής ανοσοθεραπεία (Garcia and Dreiser, 2006, Jain et.al, 2015). Η ενωρίς υποτροπή μετά τον πρώτο κύκλο BCG, θα πρέπει να ακολουθείται από επανεκτίμηση του ασθενούς για τον αποκλεισμό διηθητικής νόσου ή εξωκυστικού CIS (εντοπιζόμενου στην

προστατική ουρήθρα ή στην αποχετευτική μοίρα). Το CIS της προστατικής ουρήθρας μπορεί επίσης να αντιμετωπισθεί με BCG με πιθανότητα ανταπόκρισης 48-77%. Μερικοί προτείνουν την πραγματοποίηση διουρηθρικής προστατεκτομής πριν τις εγχύσεις BCG. Πάντως οι ασθενείς με CIS που δεν ανταποκρίθηκαν στο BCG θα πρέπει γενικά να θεωρούνται υποψήφιοι για κυστεκτομή. Να σημειωθεί ότι το 10% απ' αυτούς τους ασθενείς έχει ήδη λεμφαδενικές ή συστηματικές μεταστάσεις. Προς το παρόν δεν υπάρχουν τυχαιοποιημένες προοπτικές μελέτες που να συγκρίνουν την αποτελεσματικότητα της εξ' αρχής κυστεκτομής με την κυστεκτομή μετά BCG.

Εναλλακτικές της κυστεκτομής μορφές θεραπείας του CIS θεωρούνται η per os χορήγηση bromirimine και η φωτοδυναμική θεραπεία. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο είναι ενδιαφέρον ότι η θεραπεία με bromirimine μπορεί να είναι αποτελεσματική ακόμη και στους μη ανταποκριθέντες στο BCG, αν και ελλείπουν ακόμη μακροχρόνια αποτελέσματα. Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει την ενδοφλέβια χορήγηση ενός μίγματος πορφυρινών, όπως το HPD (hematoporphyrin derivative), το οποίο έχει την ιδιότητα να συγκεντρώνεται κατά προτίμηση σε νεοπλασματικές και δυσπλαστικές περιοχές και να καθίσταται κυτταροτοξικό όταν ενεργοποιηθεί από το φως (πχ από ακτίνες laser). Πιστεύεται ότι η κυτταροτοξικότητα οφείλεται στη δημιουργία στοιχειακού οξυγόνου που προκαλεί καταστροφή των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων. Η θεραπεία αυτή έχει το θεωρητικό πλεονέκτημα ότι είναι εκλεκτική, μπορεί όμως να προκαλέσει βλάβη του μυϊκού τοιχώματος της κύστεως με τελικό αποτέλεσμα ίνωση και ρίκνωσή της. Η δερματική φωτοευαισθησία αποτελεί μία άλλη επιπλοκή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η μέθοδος θεωρείται ακόμη πειραματική.

Η αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση του CIS αποτελεί πρόκληση για τη σύγχρονη έρευνα και προς το σκοπό αυτό βρίσκονται σε εξέλιξη διάφορες μελέτες.

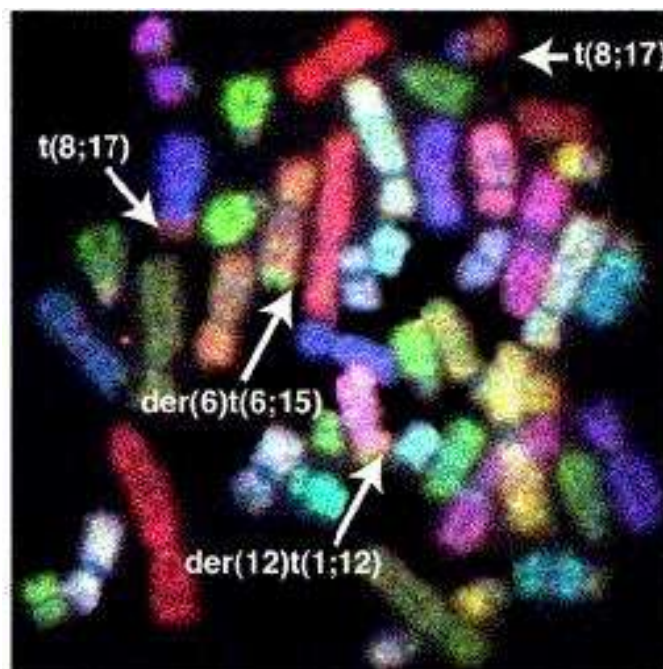
Συμπεράσματα της EORTC

Η EORTC βασισμένη σε διάφορες μελέτες έχει καταλήξει στα εξής συμπεράσματα για τη θεραπεία των επιφανειακών όγκων της κύστεως

- Ασθενείς με λιγότερες από μία υποτροπή το χρόνο ή με όγκο T₁ grade II-III ή T₁ grade I-III μπορούν να ωφεληθούν από μία εφ' άπαξ ενδοκυστική έγχυση ενός παράγοντα, 6-24 ώρες μετά την TURP.
- Οι T₁ grade I όγκοι μπορούν να αντιμετωπισθούν μόνο με TURP.
- Οι ενδοκυστικές εγχύσεις πρέπει να αρχίζουν όσο το δυνατόν νωρίτερα.
- Ασθενείς στους οποίους η έναρξη ενδοκυστικών εγχύσεων είναι άμεση, μπορούν να ωφεληθούν και από θεραπεία 6μήνου. Αντίθετα αυτοί με καθυστερημένη έναρξη χρειάζονται 12μηνη θεραπεία.
- Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες έχουν αποδειχθεί ισοδύναμοι σε συγκριτικές μελέτες.
- Σε ασθενείς με όγκους χαμηλού και μέσου κινδύνου για υποτροπή το BCG και η MMC έχουν αποδειχθεί ισοδύναμοι. Αντίθετα σε ασθενείς με όγκους υψηλού κινδύνου για υποτροπή (συνύπαρξη CIS, όγκοι T₁, 3 τουλάχιστον υποτροπές το χρόνο) το BCG υπερέχει τόσο της MMC όσο και της doxorubicin.
- Η αρχική θεραπεία εκλογής του CIS είναι το BCG και μάλιστα η θεραπεία συντήρησης είναι αποτελεσματικότερη από τη θεραπεία των 6 εβδομάδων.
- Το BCG μπορεί να αποδειχθεί αποτελεσματικό σαν δεύτερης γραμμής θεραπεία όταν οι άλλοι παράγοντες έχουν αποτύχει.

12. Γενετική προσέγγιση

Η εμφάνιση του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης φαίνεται να συσχετίζεται με την ύπαρξη τόσο δομικών αλλαγών (ελλείψεων) στο χρωμόσωμα 9 (στο 50 – 70% των κακοηθών περιστατικών) όσο και μεταλλαγών σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, χαρακτηριστικότεροι των οποίων είναι οι HRAS, KRAS2, TP53, FGFR3, Rb1 και TSC1 (Εικ. 8). Οι ελλείψεις στις χρωμοσωμικές περιοχές 9p21 και 9q32-33 περιέχουν, μεταξύ άλλων, τα γονίδια CDKN2A (p16^{INK4}) και DBCCR1, αντιστοίχως, τα προϊόντα των οποίων καταστέλλουν, ενδεχομένως, την ανάπτυξη καρκινωμάτων σε μια πληθώρα διαφορετικών ιστών, συμπεριλαμβανομένου και του μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστης (Hemminki et.al, 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη του πρωτο-ογκογονιδίου HRAS (Harvey RAS) αποκαλύφθηκε δια μέσου της δυνατότητας μετασχηματισμού NIH 3T3 κυττάρων μετά από διαμόλυνση αυτών με γονιδιωματικά θραύσματα καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης EJ και εντοπίστηκε στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11p15.5).



Εικόνα 8 : Καρυότυπος RT4 καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης με εμφανείς χρωμοσωμικές μεταλλαγές (ελλείψεις και μετατοπίσεις), υπεύθυνες για τον καρκινικό φαινότυπο.

Η συχνότερα εμφανιζόμενη σωματική μεταλλαγή του FGFR3 γονιδίου που συνδέεται με επιθηλιακούς καρκίνους αφορά στην αντικατάσταση στη θέση 249 της αντίστοιχης πρωτεΐνης του αμινοξικού καταλοίπου σερίνη (S²⁴⁹) από κυστεΐνη (C²⁴⁹), αποτέλεσμα της οποίας είναι η μη-ελεγχόμενη και συνεχής ενεργοποίηση του ομοειδούς μονοπατιού μεταγωγής σήματος και η επακόλουθη ανάπτυξη επιθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η σημειακή μεταλλαγή (μεταστροφή) της αδενίνης σε θυμίνη στο κωδικόνιο 227 του TP53 (p53) γονιδίου δημιουργεί μια δευτερογενή θέση ωρίμανσης-ματίσματος στο 7^ο εξόνιο του πρόδρομου RNA και τον επακόλουθο σχηματισμό μιας ακρωτηριασμένης TP53 πρωτεΐνης με σοβαρά αλλοιωμένο όγκο-κατασταλτικό δυναμικό, αποτέλεσμα του οποίου είναι, μεταξύ άλλων, η εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

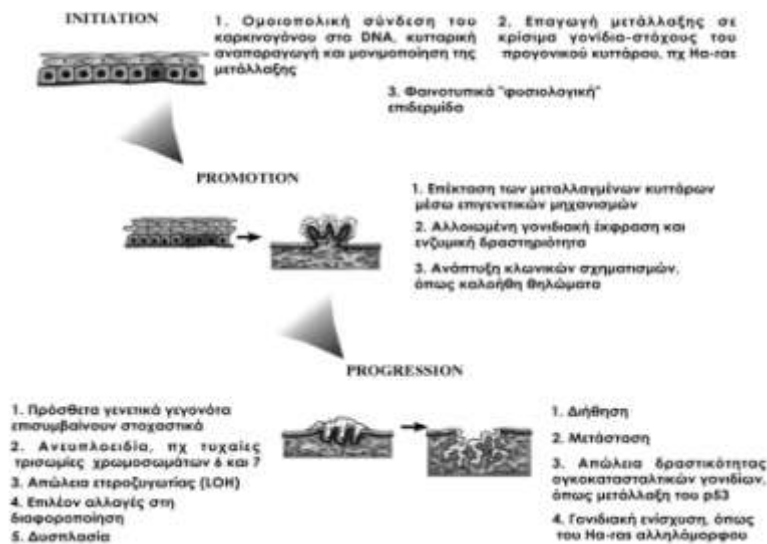
Η πλειονότητα των γενετικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης δεν φαίνεται να υπόκεινται σε κληρονομικό έλεγχο από γονείς σε απογόνους, αλλά να αποκτώνται σποραδικά (σωματικές μεταλλαγές) κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου με βάση κυρίως τις διατροφικές, εργασιακές

και πολιτισμικές του επιλογές και συνήθειες. Παρόλα αυτά, κάποια άτομα εμφανίζονται να κληρονομούν μια ιδιαίτερα μειωμένη ικανότητα αποικοδόμησης συγκεκριμένων κυτταροτοξικών ουσιών, η οποία τους καθιστά περισσότερο ευάλωτους στις καρκινογενετικές δράσεις των ενεργών συστατικών τόσο του καπνού όσο και των βιομηχανικών χημικών παραγόντων. Επιπρόσθετα, πλήθος μελετών συσχετίζουν το κάπνισμα ως κύριο προδιαθεσικό παράγοντα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης με την δομική ακεραιότητα και λειτουργική ικανότητα διακριτών γενετικών τόπων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι NAT1, NAT2 και GSTM1 (Knowles and Hirst, 2015).

13. Η έννοια της καρκινογένεσης

Η καρκινογένεση μπορεί να οριστεί ως η χρόνια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη κυτταρική και ιστική διαφοροποίηση και η οποία καταλήγει στην ανάπτυξη διηθητικού και μεταστατικού καρκίνου (Κωστακόπουλος 2003). Είναι μια διαδικασία προοδευτικής αποδιοργάνωσης και απώλειας ελέγχου των φυσιολογικών μηχανισμών ομοιόστασης, ως αποτέλεσμα άθροισης γεγονότων που συνδέονται με εξωγενείς (περιβαλλοντικούς) και ενδογενείς (γενετικούς, ορμονικούς, ανοσολογικούς) παράγοντες (Εικ.9). Η καρκινογένεση των επιθηλιακών όγκων περιλαμβάνει γενετικές μεταλλάξεις, αυξημένη κυτταρική αναπαραγωγή και αλλαγές στο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον, κυρίως στην αλληλεπίδραση του επιθηλίου με το υποκείμενο στρώμα Κοινή κατάληξη των παραπάνω διαδικασιών είναι η αλλοίωση του γονοτύπου, ως αποτέλεσμα επιγενετικών τροποποιήσεων του DNA (διαταραχή του φυσιολογικού μηχανισμού μεθυλίωσης κυτοσίνης), χρωμοσωμικής αστάθειας (ως αποτέλεσμα θραύσης χρωμοσωμάτων ή αναδιάταξης του χρωμοσωμικού υλικού) και σημειακών μεταλλάξεων στην κωδικοποιό αλληλουχία του DNA (Κωστακόπουλος 2003).. Το κοινό χαρακτηριστικό των μεταλλάξεων που συναντώνται στον παραπάνω κυτταρικό πληθυσμό είναι η ιδιότητά τους να ευνοούν την επιβίωση και κλωνική επέκταση των κυττάρων που τις φέρουν. Νέες γενετικές εκτροπές συνεχώς προστίθενται και η δυναμική φύση της καρκινογένεσης επιβεβαιώνεται από την παρατήρηση ότι τα κύτταρα σταδιακά γίνονται ικανά να διηθούν και να μεθίστανται, αλλά και πολύ αργότερα, όταν κλινικά πλέον διαπιστώνεται η προοδευτική αντίσταση στη χημειοθεραπεία.

Σχηματικά τα στάδια της καρκινογένεσης είναι:

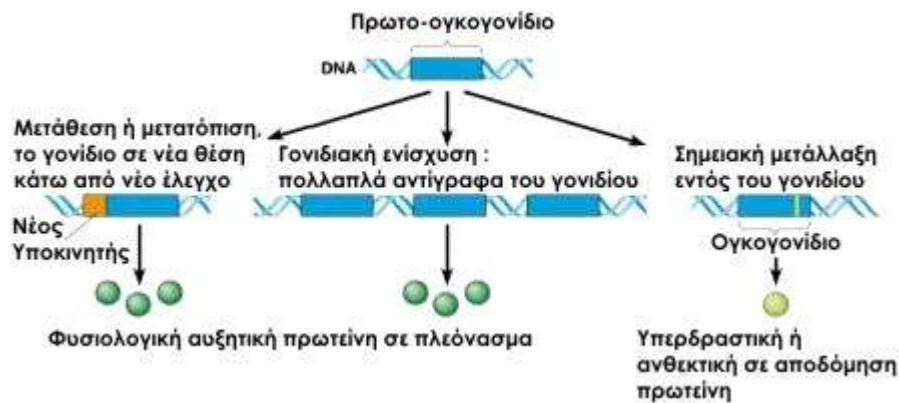


Εικ.9 Τα στάδια της καρκινογένεσης

Α)Εναρξη-Initiation:Βλάβη του γονιδιώματος μετά από έκθεση σε εξωγενή ή ενδογενή καρκινογόνο παράγοντα. Τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα δεν συνεχίζουν ποτέ στα επόμενα στάδια, αλλά παραμένουν σε ηρεμία για το υπόλοιπο της ζωής τους. Ο φαινότυπος του κυττάρου που έχει υποστεί τη γενετική βλάβη, μεταβάλλεται ελάχιστα έως καθόλου, ώστε να μην είναι δυνατό να αναγνωριστεί μορφολογικά (Mazzuchelli et.al, 2014, Malats and Real, 2015).

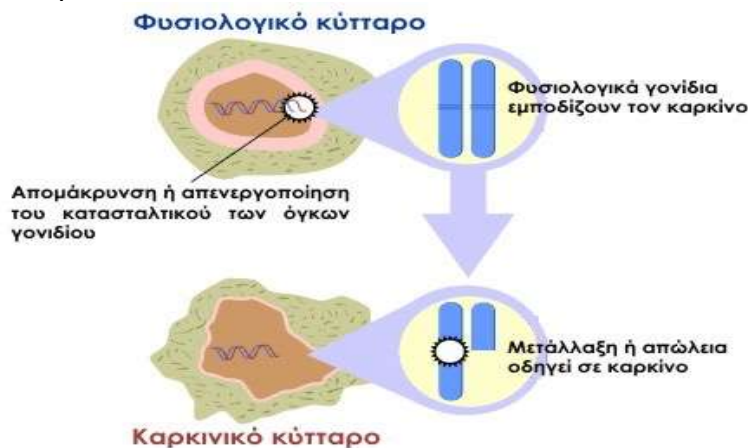
Β)Προαγωγή –Promotion:Υπό την επίδραση ενδογενών (πχ ορμόνες) ή εξωγενών (πχ TPA) χημικών ενώσεων τροποποιείται η μεταγραφή γονιδίων υπευθυνων για την αθξηση ,αποπτωση και διαφοροποιηση ,με αποτέλεσμα να προαγεται η κλωνικη επεκταση του κυτταρικου υποπληθυσμου, με φαινοτυπικη εκδηλωση την αναπτυξη καλοηθων ογκων

Γ)Πρόοδος –Progression:Κύριο χαρακτηριστικό του 3^{ου} σταδίου είναι οι γενετικές μεταβολές των προνεοπλασματικών κυττάρων που του προσδίδουν σταδιακά τα χαρακτηριστικά κακοήθειας. Κατά τη φάση αυτή ολόκληρο το γονιδίωμα να εμφανίζει αστάθεια, που εκδηλώνεται με καρυοτυπικές αλλοιώσεις, οι οποίες προσδίδουν στο κύτταρο χαρακτηριστικά όπως αναπλασία, διήθηση, μετάσταση, αντοχή στη χημειοθεραπεία και διαταραγμένη χρονική και ιστική έκφραση γονιδίων. Στην διαδικασία της καρκινογένεσης εμπλέκονται και δύο μεγάλες κατηγορίες γονιδίων: (α)**Πρωτο-ογκογονίδια:** Αποτελούν μια ομάδα φυσιολογικών κυτταρικών γονιδίων, η ανώμαλη ενεργοποίησή των οποίων τα μετατρέπει σε ογκογονίδια, που σχετίζονται με την κακοήγη εξαλλαγή (Εικ 10). Έχουν αναφερθεί διάφορα ογκογονίδια που συνοδεύονται με τον καρκίνο της κύστεως, όπως *tor21 gas* ογκογονιδιο, το *c-myc* το οποίο έχει συνδυασθεί με αυξημένη συχνότητα υποτροπής και εξέλιξης των επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστεως, το ογκογονίδιο *c-jun*, το οποίο κωδικοποιεί το μείζον στοιχείο του παράγοντα μεταγραφής AP-1 και παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης. Η έκφραση του τελευταίου ογκογονιδίου σχετίζεται με αυξημένη διηθητικότητα του όγκου και αυξημένη έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) (Knowles and Hirst, 2015).



Εικ. 10 Συμμετοχή πρωτο-ογκογονιδίων στην κακοήθη εξαλλαγή

(β) Ογκοκατασταλτικά γονίδια : Συνήθως έχουν περιοριστική λειτουργία για τον κυτταρικό κύκλο (Εικ.11). Όταν υφίστανται μεταλλάξεις που έχουν αποτέλεσμα απώλεια της λειτουργίας τους, προκύπτουν υπολειπόμενα γονίδια, τα οποία ενοχοποιούνται σε διάφορους κληρονομικούς τύπους καρκίνου. (Knowles and Hirst, 2015) Τρία κατασταλτικά γονίδια έχουν συνδυασθεί με τον καρκίνο της κύστεως. Το p53 στο χρωμόσωμα 17p, το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (γονίδιο Rb) στο χρωμόσωμα 13q, και γονίδια στο χρωμόσωμα 9, ένα από τα οποία φαίνονται ότι είναι το 9p στην περιοχή 9p21. Η απενεργοποίηση του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (pRb) μέσω γενετικής αναστολής ή μετάλλαξης, επιτρέπει τη μετάβαση των κυττάρων πιο εύκολα από τη φάση G1 στη φάση S, διεγείροντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι αναστολείς επίσης των κινασών, που φωσφορυλιώνουν το pRb διαχωρίζοντας το από τον παράγοντα μεταγραφής E2F, δρουν σαν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Mazzuchelli et.al, 2014)



Εικ. 11. Συμμετοχή κατασταλτικών των όγκων γονιδίων στην κακοήθη εξαλλαγή

14. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Ο βλεννογόνος της ουροδόχου κύστης έρχεται σε επαφή για μεγάλο χρονικό διάστημα με σχεδόν όλους τους μεταβολίτες των προσλαμβανόμενων ουσιών, περιλαμβανομένων των δυνητικά καρκινογόνων (π.χ., νιτροζοενώσεις), εξαιτίας του αποθηκευτικού ρόλου της κύστης. Ο καρκίνος της κύστης θεωρείται ως ένα μοντέλο περιβαλλοντικής καρκινογένεσης, πολλαπλών σταδίων, με εναρκτήριους και προωθητικούς παράγοντες. Αν και είναι πιθανός ο μετασχηματισμός μιας καρκινικής βλάβης χαμηλού ιστολογικού βαθμού σε υψηλότερο βαθμό, υποστηρίζεται ότι συνήθως οι καρκινικές βλάβες υψηλού ιστολογικού βαθμού προέρχονται εξαρχής από αντίστοιχες γενετικές βλάβες (Letasiova et.al, 2012, Jian et.al, 2015).

Όπως προαναφέρθηκε έχουν αναγνωρισθεί αρκετά ειδικά καρκινογόνα για την ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Παραδείγματα τέτοιων καρκινογόνων (σε πειραματόζωα) είναι η Ν-βουτυλ-Ν-(4-υδροξυβουτυλ) νιτροζαμίνη (BBN), η Ν-μεθυλ-Ν-νιτροζουρία (MNU) και το Ν-4-(5νιτρο-2-φουρυλ)-2θειαζολυλ-φουραμίδιο (FANFT). Υποστηρίζεται ότι η χορήγηση του καρκινογόνου θα πρέπει να υπερβεί μια ελάχιστη συνολική δόση για να προκληθεί καρκινική ανάπτυξη. Για παράδειγμα, 0.05% BBN δεν είναι καρκινογόνο αν χορηγηθεί για 4 εβδομάδες αλλά προκαλεί 100% καρκίνο αν χορηγηθεί για >10 εβδομάδες. Επίσης, αν χορηγηθεί ποσότητα καρκινογόνου μεγαλύτερη της ελάχιστης, σε πολλές μικρότερες δόσεις, προκαλεί συχνότερα καρκίνο, παρά αν δοθεί σε μια μόνο δόση.²² Πιθανή εξήγηση είναι ότι όσο μεγαλύτερη είναι η δόση, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα θανατηφόρου, παρά μεταλλακτικού αποτελέσματος στο γενετικό υλικό του κυττάρου και άρα μικρότερος ο αριθμός των δυνητικά καρκινικών κυττάρων που επιζούν. Οι μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η καρκινογένεση στην κύστη μπορεί να είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων.²¹ Επίσης, σε πειραματόζωα που δόθηκε υποκαρκινογόνος δόση MNU και ζαχαρίνης διαπιστώθηκε στο 50% νεοπλασία, δίνοντας έμφαση στο ρόλο της συνέργειας μιας μικρής δόσης καρκινογόνου με ουσίες που από μόνες τους έχουν ελάχιστη καρκινογόνο δράση.

Ένα προτεινόμενο παθογενετικό μοντέλο ανάπτυξης του καρκίνου της κύστης περιλαμβάνει το στάδιο της έναρξης, της προαγωγής και της κακοήθους εξαλλαγής.²² Στο στάδιο της έναρξης το καρκινογόνο ή οι μεταβολίτες του, αλληλεπιδρούν με το DNA του κυττάρου οδηγώντας σε μετάλλαξη του σε καρκινικό, ή τροποποίηση του γενότυπου χωρίς όμως φαινοτυπική εκδήλωση. Στην περίπτωση των MNU και BBN, οι μεταβολίτες τους αλκυλιώνουν το DNA σε πολλά σημεία. Υποστηρίζεται ότι η σημαντικότερη προκαρκινική βλάβη είναι η αλκυλίωση της γουανίνης στη θέση O₆ και ο σχηματισμός της O₆-αλκυλογουανίνης, που προκαλεί βλάβες στο DNA κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού των κυττάρων.

Στο αρχικό στάδιο της προαγωγής διάφοροι προωθητές (π.χ., ζαχαρίνη) αλληλεπιδρούν με υποδοχείς/ένζυμα, όπως η πρωτεϊνική κινάση C που ελέγχει μέσω φωσφορυλιώσεων την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων, όπως της ορνιθίν-δεκαρβοξυλάσης που ρυθμίζει τη σύνθεση των πολυαμινών (πιτρεσίνη, σπερμιδίνη, σπερμίνη) και οι οποίες ρυθμίζουν με τη σειρά τους τη σύνθεση του DNA. Η αποφυγή επαφής με τους προωθητικούς παράγοντες μπορεί να εμποδίσει τη φαινοτυπική εκδήλωση του καρκίνου της κύστης σε άτομα που βρίσκονται στο στάδιο έναρξης της καρκινογένεσης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται έρευνες με τους ανταγωνιστές των προωθητών, όπως για παράδειγμα τα ρετινοειδή (ανάλογα της βιταμίνης Α).

Ειδικότερα, για την ανάπτυξη της κακοήθειας απαιτείται δράση επί του γενετικού υλικού, ικανή να ενεργοποιήσει κατασταλαμένα ογκογονίδια, ή/και να καταστείλει ογκοκατασταλτικά γονίδια, οδηγώντας σε γενετική βλάβη και κακοήθη εξαλλαγή (Jian et.al, 2015) Μία υποκείμενη μετάλλαξη ή απώλεια του υπολειπόμενου αλληλόμορφου, μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) αφορά σε υπομικροσκοπικές εξαλείψεις γενετικού υλικού και μπορεί να ανιχνευτεί χρησιμοποιώντας τεχνικές PCR (polymerase chain reaction). Μια άλλη μέθοδος ταυτοποίησης γενετικών βλαβών είναι η τεχνική της συγκριτικής γονιδιακής υβριδοποίησης (CGH), όπου το DNA από τα φυσιολογικά κύτταρα και τα κύτταρα του καρκινικού όγκου σημαίνεται φθοριοσκοπικά

Ο ρόλος των μεταγωγικών μονοπατιών των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Δύο γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια, το Rb και το p53, έχουν συνδεθεί αιτιοπαθογενετικά με την ανάπτυξη του καρκίνου της κύστης. Η βλάβη ή απώλεια

αυτών των γονιδίων εμπλέκεται στην εξέλιξη, διήθηση και μετάσταση του καρκίνου της κύστης (Burgess, 2015).

Το γονίδιο p53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και παράγει τη φωσφονουκλεοπρωτεΐνη TSG, που καταστέλλει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων μέσω μη ειδικής σύνδεσης με το DNA. Απώλεια ή μετάλλαξη του γονιδίου p53 απαντάται σε >50% των νεοπλασιών στον άνθρωπο και εντοπίζεται συνήθως στα αμινοξέα της κεντρικής περιοχής του γονιδίου. Πρόσφατη μελέτη παρατήρησε LOH, ή μικροδορυφορικές (microsatellite) αλλαγές στον επίτοπο 17p13, στο 97% των ασθενών με επιφανειακό όγκο κύστης (Jian et.al, 2015). Άλλες μελέτες αναφέρουν εξαλείψεις στο 17p σε ποσοστό >60% σε φτωχά διαφοροποιημένους όγκους της κύστης.³⁰ Στον καρκίνο της κύστης, οι μεταλλάξεις του p53 αφορούν κυρίως στα εξόνια 4-9 και έχουν συσχετιστεί με προδιαθεσικούς παράγοντες όπως η έκθεση σε αρωματικές αμίνες και η σχιστοσωμίαση. Στα φυσιολογικά κύτταρα η δραστηριότητα του p53 αυξάνει ως απάντηση στο κυτταρικό stress, τη βλάβη του DNA και την υποξία, οδηγώντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου, διαφοροποίηση ή/και απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), μειώνοντας την πιθανότητα πολλαπλασιασμού μεταλλαγμένων καρκινικών κυττάρων (Burgess, 2015). Για παράδειγμα, όταν ένας όγκος φτάσει σ' ένα κρίσιμο μέγεθος όπου η αιματική ροή δεν επαρκεί για την οξυγόνωσή του, λόγω της υφιστάμενης υποξίας, το p53 οδηγεί σε απόπτωση μέσω της επαγωγής της μεταγραφής της θρομβοσπονδίνης, που είναι ένας αναστολέας της αγγειογένεσης (Leow et.al, 2014)

Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης p53 εμπλέκεται στην μεταγραφική ενεργοποίηση του πρωτοογκογονιδίου mdm2 (murine double minute 2), το πρωτεϊνικό προϊόν του οποίου (MDM2) προκαλεί αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στο p53, μέσω της μεταφοράς του στο κυτταρόπλασμα και της αποδόμησής του από το πρωτεόσωμα. Η γονιδιακή ενίσχυση του mdm2 έχει διαπιστωθεί στον καρκίνο της κύστης και κυρίως σε όγκους χαμηλού ιστολογικού βαθμού.³⁴ Επίσης, έχουν βρεθεί μεταγραφικά προϊόντα της πρωτεΐνης MDM2 τα οποία εμφανίζουν εναλλακτική κατάτμηση (alternative splicing) και δεν έχουν περιοχή σύνδεσης για το p53, τα οποία και απαντώνται συνήθως σε όγκους υψηλού σταδίου και χαμηλής διαφοροποίησης.³⁵ Έχει διαπιστωθεί θετική χρώση για την ογκοπρωτεΐνη MDM2 στο 30% των όγκων της κύστης, σχετιζόμενη με χαμηλό στάδιο και καλή διαφοροποίηση.³⁴ Η υπερέκφραση της MDM2 σχετίζεται με ανοσοϊστοχημική θετικότητα του p53 και ο λόγος MDM2/p53 έχει σημαντική προγνωστική σημασία.

Φυσιολογικά, η πρωτεΐνη p53 ρυθμίζει την έκφραση αντι-αγγειογενετικών παραγόντων όπως η θρομβοσπονδίνη-1, η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη, ενώ παράλληλα αναστέλλει και την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF (vascular endothelial growth factor), ο PDECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor), ο TGF-β (transforming growth factor) και ενζύμων όπως η NOS (nitric oxide synthase). Ο μη μεταλλαγμένος φυσιολογικός τύπος του p53 (wild type) βρίσκεται σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες, παρουσιάζοντας μεγάλο ρυθμό σύνθεσης και αποδόμησης (μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της ομπικιτίνης), που εξαρτάται από τη σύνδεσή του με την ογκοπρωτεΐνη MDM2 (Burgess, 2015). Ανώμαλα p53 γονίδια παράγουν μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, η οποία δεν έχει τις ρυθμιστικές ιδιότητες του φυσιολογικού γονιδίου και έχει μακρό χρόνο ημίσειας ζωής. Οι πιο συχνές σημειακές μεταλλάξεις στο p53 είναι η αλλαγή των βάσεων G-C σε A-T. Σύμφωνα με μελέτες, στον καρκίνο της κύστης το ποσοστό ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 είναι περίπου 90%, ιδίως σε υποτροπιάζοντες όγκους. Έχει διαπιστωθεί ότι ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης p53 αποτελεί έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη και υποτροπή του επιφανειακού όγκου της κύστης, καθώς και του CIS. Η παρουσία μετάλλαξης του p53 αυξάνει την πιθανότητα κακής πρόγνωσης, ενώ παράλληλα η αυξημένη έκφραση του

p53 σχετίζεται με όγκους υψηλού σταδίου και ιστολογικού βαθμού. Η απώλεια του 17p είναι σπάνια στους επιφανειακούς όγκους της κύστης, σε αντίθεση με τους διηθητικούς όγκους όπου στο 70% έχει χαθεί η φυσιολογική λειτουργία του p53 (Jordan and Iyer, 2015).

Στα μεταγωγικά μονοπάτια δράσης της πρωτεΐνης p53 σημαντικό ρόλο παίζουν και οι πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος (Rb: p105, p7, p30), όπου το αντίστοιχο γονίδιο βρίσκεται στο 13q. Οι πρωτεΐνες αυτές σταματούν τον κυτταρικό κύκλο μπλοκάροντας τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F (E2F 1-5), που προωθούν τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για το διπλασιασμό του DNA και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, όταν η πρωτεΐνη Rb φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες των κυκλινών (CDKs) σταματά να συνδέεται με την E2F, αίρεται η καταστολή της λειτουργίας του E2F και ο κυτταρικός κύκλος εξελίσσεται. Αντίθετα, η επαγωγή από την p53 της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 (αναστολέας των CDKs), οδηγεί σε μπλοκάρισμα της δράσης του E2F και κατ'επέκταση του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη p21 που κωδικοποιείται από το γονίδιο WAF1/CIP1 (wild-type p53-activated fragment 1 / cyclin-dependent kinases interacting protein 1), εκτός της αναστολής της μετάβασης G₁-S, αναστέλλει και το διπλασιασμό του DNA στην φάση S μπλοκάροντας τη δράση του PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Mazzuchelli et.al, 2014). Θετική ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης p21 έχει παρατηρηθεί περίπου στο 40% των περιπτώσεων των επιφανειακών όγκων της κύστης. Έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό και το στάδιο του όγκου και συνδέεται με μειωμένη πιθανότητα υποτροπής και αυξημένη πιθανότητα συνολικής επιβίωσης, σε σύγκριση με την αρνητική χρώση.

Η απώλεια του Rb έχει διαπιστωθεί στον καρκίνο της κύστης, ιδιαίτερα σε διηθητική και μεταστατική νόσο. Συγκεκριμένα, απενεργοποίηση του Rb γονιδίου (μέσω LOH ή μεταλλάξεων) έχει διαπιστωθεί στο 37% των διηθητικών όγκων της κύστης. Η πιο συχνή απενεργοποίηση του Rb γονιδίου πραγματοποιείται μέσω εξάλειψης στο χρωμόσωμα 13q, που ανιχνεύεται σε ποσοστό 14-80%. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 και όχι της Rb, σχετίζεται με διήθηση και χαμηλή διαφοροποίηση. Έτσι, η απώλεια του Rb σε συνδυασμό με την υπερέκφραση του p53, συνδυάζεται με αυξημένη διήθηση του όγκου. Αυτό επιβεβαιώθηκε και με τη μελέτη του Ki67 (δείκτης πολλαπλασιασμού, ο οποίος εκφράζεται σ' όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός από τη G₀). Ο Ki67 σχετίζεται ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό και το στάδιο του όγκου, αποτελώντας ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα των υποτροπών των επιφανειακών όγκων της κύστης.

Το σύμπλεγμα της κυκλίνης D και της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης CDK4 είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb στη φάση G₁, συμβάλλοντας στην μετάβαση στην φάση S, ενώ παράλληλα η διαδικασία αυτή επιταχύνεται από το σύμπλεγμα κυκλίνης E-CDK2. Άλλα συμπλέγματα κυκλίνης-CDK (κυκλίνη A-CDK2, κυκλίνη B-CDK2) διατηρούν μονίμως φωσφορυλιωμένη την Rb μέχρι να ολοκληρωθεί η μίτωση και να ξαναμπει το κύτταρο στη φάση G₁. Τα διαπλεκόμενα μονοπάτια p53 και pRb περιλαμβάνουν κοινά γονίδια που ελέγχουν τη μετάβαση από τη φάση G στη φάση S, καθώς και την απάντηση σε βλάβη του DNA ή σε μιτογόνα ερεθίσματα.²⁸ Μελέτες αναφέρουν μεγαλύτερη έκφραση των CDKs στον επιφανειακό σε σχέση με το διηθητικό καρκίνο της κύστης, ενώ βρέθηκε και ότι όγκοι με υπερέκφραση της κυκλίνης D1 υποτροπιάζουν πιο συχνά. Υποστηρίζεται, ότι η απενεργοποίηση των αναστολέων CDKs (p15, p16, p21) εμπλέκεται στην παθογένεια των όγκων χαμηλού ιστολογικού βαθμού, ενώ στους καρκίνους υψηλού ιστολογικού βαθμού ενοχοποιούνται κυρίως βλάβες του p53. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός χαμηλών επιπέδων κυκλίνης D1, p27 και υψηλών επιπέδων Ki67, χαρακτηρίζει όγκους υψηλού κινδύνου για υποτροπή (Volanis et.al, 2011).

Στο κέντρο του μηχανισμού ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βρίσκεται ο επίτοπος INK4A/ARF και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιεί, που είναι η p16 και η p14. Στο ένα μονοπάτι, το γονίδιο p16 αναστέλλει τη δραστηριότητα των συμπλεγμάτων CDK με την κυκλίνη, με συνέπεια η φωσφορυλιωμένη Rb να μη μπορεί να συνδεθεί με τον E2F1 και έτσι ο E2F1 να μεταγράφει γονίδια που απαιτούνται για την εξέλιξη προς την φάση S. Στο δεύτερο μονοπάτι, το γονίδιο p14 αυξάνει τα επίπεδα της p53, που αναστέλλει την εξέλιξη φάσης G, μέσω της αύξησης του p21. Διαπιστώθηκε ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p21 σχετιζόταν αντίστροφα με το στάδιο, το βαθμό διαφοροποίησης, τη συσσώρευση πρωτεΐνης p53 και την έκφραση του Ki67. Ένα άλλο επίπεδο ελέγχου αποτελεί και η έκφραση του p14, που με τη σειρά του ρυθμίζεται από τον E2F1, προκαλώντας έτσι παλίνδρομη ρύθμιση του συμπλέγματος CDK4-κυκλίνης D1 μέσω του μονοπατιού του p53. Παρομοίως, η έκφραση του ογκογονιδίου *ras* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του p14 και του p16 συμβάλλοντας στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Το σημείο ελέγχου της φάσης G μπορεί να ξεπεραστεί είτε μέσω απενεργοποίησης του Rb ή του INK4A, είτε μέσω της υπερέκφρασης του γονιδίου CCND, αλλά και της απενεργοποίησης του p14. Υποστηρίζεται ότι η κακοήθης εξαλλαγή των κυττάρων που δεν έχουν λειτουργικό p53 οφείλεται σε αδυναμία του μεταλλαγμένου p53 να αυξήσει την παραγωγή του p21/WAF1, οπότε και τα κύτταρα αδυνατούν να βγουν από τη φάση S, συνθέτουν διαρκώς DNA χωρίς να υποστούν καμία μίτωση, με αποτέλεσμα να γίνονται ανευπλοειδικά με πυρηνικές ανωμαλίες και να είναι ευάλωτα στη δράση των καρκινογόνων.

Το πρωτοογκογονίδιο c-Erb-B2 κωδικοποιεί τη γλυκοπρωτεΐνη p185HER-2/neu που έχει πολύ μεγάλη ομοιότητα με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα (TGF- α), των οποίων η έκφραση σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Griffiths, 2013) Έχει διαπιστωθεί ότι ο p185HER-2/neu υπερεκφράζεται στον καρκίνο της κύστης (σε ποσοστό 40%), κυρίως λόγω γονιδιακής ενίσχυσης του c-Erb-B2, ιδίως σε υψηλό ιστολογικό βαθμό και στάδιο. Επίσης, έχει διαπιστωθεί μεγαλύτερη ανίχνευση του EGFR σε όγκους υψηλού ιστολογικού βαθμού. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ενώ φυσιολογικά EGFR-θετικά κύτταρα εντοπίζονται μόνο στη βασική μεμβράνη, στον καρκίνο της κύστης εντοπίζονται σ' όλη την έκταση του ουροθηλίου (Επίσης, οι παράγοντες TGF- α , α - / b-FGF (acid- / basic-fibroblastgrowthfactor) έχουν βρεθεί σε αυξημένες ποσότητες στα ούρα ασθενών με καρκίνο της κύστης. Τα αυξημένα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων που παράγονται από τα κύτταρα του ουροθηλίου, καθώς και των αντίστοιχων υποδοχέων τους αποτελούν έναν κοινό μηχανισμό καρκινογένεσης, μέσω συνεχούς μιτογόνου δράσης. Μάλιστα, τα επίπεδά τους (π.χ., EGFR) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως προγνωστικοί δείκτες για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της συμπληρωματικής ενδοκυστεικής θεραπείας (Mooso et.al, 2015).

Άλλα ογκογονίδια που υφίστανται μεταλλάξεις και ενέχονται στην παθογένεια του καρκίνου της κύστης είναι αυτά της Ras οικογένειας (Harvey-, Kirsten-, και N-RAS), που ανιχνεύονται σε ποσοστό 10-45% (Mooso et.al, 2015). Η ογκοπρωτεΐνη RAS σχετίζεται με τις G-πρωτεΐνες στην κυτταρική μεμβράνη και εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος από τους μεμβρανικούς υποδοχείς στους καταρράκτες διαδοχικών φωσφορυλιώσεων, κυρίως μέσω των μονοπατιών των MAPKs (mitogen activated protein kinases). Το γονίδιο H-Ras κωδικοποιεί την p21, μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη με την μεμβράνη που μεταφέρει ενδοκυττάρια μεταγωγικά σήματα. Οι συχνότερες μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευτεί, αφορούν στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του H-RAS, στα κωδικόνια 12 και 59 του K-RAS και στο κωδικόνιο 61 του N-RAS. Έχει διαπιστωθεί ότι μ' αυτές τις μεταλλάξεις επάγεται η GTP σύνδεση της πρωτεΐνης RAS, ενώ αναστέλλεται η υδρόλυση του GTP, με συνέπεια τη συνεχή μιτογόνο δράση. Οι

μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό του όγκου και μπορούν να ανιχνευτούν με ειδικές μεθόδους στα ούρα (π.χ., SSCP; single-strand conformation polymorphism).

Μοριακή Βιολογία

Η πρόοδος που έχει συντελεστεί τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη των διαγνωστικών τεχνικών της μοριακής βιολογίας, οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση της γενετικής του καρκίνου και κατ' επέκταση παρείχε τη βάση ώστε να μπορούμε πλέον να προβλέψουμε με μεγάλη ακρίβεια και την κλινική συμπεριφορά πολλών νεοπλασμάτων τα οποία εμφανίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Η καρκινογένεση δεν είναι μια απλή διαδικασία, αλλά μια αλληλουχία γενετικών αλλαγών οι οποίες αφορούν τους κυτταρικούς μηχανισμούς αύξησης, διαφοροποίησης και απόπτωσης, και οδηγούν στη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε νεοπλασματικό.

Στην καρκινογένεση εμπλέκονται δύο γενετικοί μηχανισμοί:

1. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων
2. Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Ως ιδιαίτερος μηχανισμός καρκινογένεσης θα μπορούσε να θεωρηθεί η ενίσχυση ή υπερέκφραση ορισμένων φυσιολογικών γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες.

Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένα φυσιολογικά γονίδια, τα οποία προάγουν την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό, κυρίως επιτρέποντας στο κύτταρο να διαφεύγει από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ελέγχου της ανάπτυξης. Η ανενεργός μορφή τους είναι τα πρωτοογκογονίδια από τα οποία προέρχονται με μια σειρά διεργασιών (πχ σημειακή μετάλλαξη, έλλειψη). Τα πρωτοογκογονίδια κωδικοποιούν μια σειρά προϊόντων που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα της κυτταρικής δραστηριότητας. Στα προϊόντα αυτά περιλαμβάνονται αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς τους, πρωτείνες-διαβιβαστές εξωτερικών σημάτων (P21 ή G), πυρηνικές πρωτείνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του DNA κλπ

Στον καρκίνο της κύστεως εμπλέκονται κυρίως τα εξής ογκογονίδια (Reuter, 2006, Griffiths, 2013, Jordan and Iyer, 2015):

α) H- ras

Τα γονίδια της οικογενείας Ras (H-ras, K-ras, N-ras), είναι μέρη μιας πολυγονιδιακής οικογένειας, που κωδικοποιεί μια ομάδα πρωτεϊνών, γνωστών με το όνομα P21 ή G, οι οποίες θεωρούνται μεταβιβαστές σημάτων από υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας στο κυτταρόπλασμα, όπου ειδικά ένζυμα (φωσφολιπάσες) παράγουν ένα δεύτερο μήνυμα που οδηγεί σε κυτταρική αύξηση. Σημειακή μετάλλαξη των γονιδίων Ras οδηγεί σε υπερπαραγωγή ή αλλαγή της δομής των G πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την υπερδιέγερση των φωσφολιπασών και τελικά την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση.

Η συχνότητα ανεύρεσης μεταλλαγμένου H-ras γονιδίου στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως δεν είναι απολύτως γνωστή, επειδή οι σχετικές με το θέμα μελέτες, ακόμη και οι πιο πρόσφατες, παρέχουν διαφορετικά αποτελέσματα (από 7 έως και 36%). Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα ίσως υποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη του H-ras συμβαίνει μόνο σε υποπληθυσμούς κυττάρων και ότι επέρχεται σχετικά αργά στη διαδικασία της ογκογένεσης. Πάντως, παρ' ότι υπάρχουν μελέτες που σχετίζουν το H-ras με υψηλότερο στάδιο Ca κύστεως, αυτό δεν είναι προς το παρόν ευρέως αποδεκτό.

β) c-myc

Ο ρόλος του ογκογονιδίου c- myc έχει επιβεβαιωθεί σε πολλούς καρκίνους. Η αυξημένη έκφραση του ογκογονιδίου αυτού προάγει την κυτταρική διαίρεση αλλά αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση. Τελικό αποτέλεσμα είναι ένας μεγάλος πληθυσμός αδιαφοροποίητων κυττάρων με ικανό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, που είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην επίδραση οποιουδήποτε ογκογόνου παράγοντα.

Η αυξημένη έκφραση του c-myc έχει συσχετισθεί με αυξημένη συχνότητα, τόσο υποτροπής του καρκίνου της κύστεως, όσο και μετατροπής σε διηθητικό (44). Επιπροσθέτως έχει δειχθεί ότι το c-myc σχετίζεται με υψηλότερο στάδιο και grade του όγκου αυτού .

γ) erbB-1, erbB-2

Ιδιαίτερος καρκινογενετικός μηχανισμός θεωρείται η ενίσχυση ή υπερέκφραση ορισμένων φυσιολογικών γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες ή τους υποδοχείς τους. Οι αυξητικοί παράγοντες, όπως είναι γνωστό, είναι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Το πρωτοογκογονίδιο c-erbB-1 κωδικοποιεί τον υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor), τον EGFR. Στη φυσιολογική κύστη ο EGF εκκρίνεται στα ούρα σε μεγάλες ποσότητες και δεσμεύεται από τον EGFR που όμως εκφράζεται μόνο στα κύτταρα των βασικών στιβάδων του ουροθηλίου. Συνεπώς η ανάπτυξη του ουροθηλίου είναι κανονική και ελεγχόμενη. Αντίθετα στον καρκίνο ο EGFR υπερεκφράζεται σ'όλες τις στιβάδες, υπάρχουν δηλ. πολύ περισσότεροι υποδοχείς στο ουροθήλιο για τη σύνδεση του EGF με τελικό αποτέλεσμα τον γρήγορο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων. Είναι επομένως προφανές ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση του EGFR με τον καρκίνο της κύστεως και μάλιστα έχει δειχθεί πειραματικά ότι η αυξημένη του έκφραση σχετίζεται με πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά, δηλ. με υψηλότερο στάδιο και grade . Το γονίδιο για τον EGFR βρίσκεται στο χρωματόσωμα 7. Η ύπαρξη και τρίτου χρωματοσώματος 7, (τρισωμία 7), έχει συσχετισθεί με το Ca κύστεως και μάλιστα τις επιθετικές μορφές του .

Το γονίδιο erbB-2 κωδικοποιεί ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα, ομόλογο του EGFR. Σ' ένα ποσοστό όγκων κύστεως βρέθηκε ότι υπάρχει ενίσχυση του γονιδίου αυτού, η οποία οδηγεί σε υπερέκφραση του πρωτεϊνικού παραγώγου p-185. Πάντως υπερέκφραση του p-185 ανιχνεύεται και σε όγκους χωρίς ενίσχυση του erbB-2. Ο μοριακός μηχανισμός που προκαλεί αυτό το φαινόμενο δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Με τα σημερινά δεδομένα ο καρκίνος της κύστεως δεν μπορεί εύκολα να συσχετισθεί με ενίσχυση κάποιου συγκεκριμένου γονιδίου.

Ογκοκατασταλτικάγονίδια (Tumour suppressor genes- TSGs)

Είναι γονίδια η απενεργοποίηση των οποίων οδηγεί σε μια σειρά μοριακών ή κυτταρικών φαινομένων, με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκίνου. Γενικά τα TSGs δεν έχουν μελετηθεί λεπτομερώς όπως τα ογκογονίδια, πολλά όμως απ' αυτά έχουν αναγνωρισθεί ως αναμφισβήτητοι αιτιολογικοί παράγοντες διαφόρων μορφών καρκίνου. Για να προκληθεί καρκίνος από την απώλεια της δράσης ενός TSG, θα πρέπει η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό να καταστεί μη λειτουργική. Αυτό προϋποθέτει την με οποιοδήποτε μηχανισμό αδρανοποίηση και των δύο αλληλίων του γονιδίου (41). Κυτταρογενετικές μελέτες διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων έχουν δείξει έλλειψη του ενός από τα δύο αλληλία που υπάρχουν σε φυσιολογικά κύτταρα, φαινόμενο που ονομάζεται απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity-LOH) και θεωρείται απόδειξη της απενεργοποίησης ενός TSG, αφού στο απωλεσθέν τμήμα του χρωματοσώματος βρίσκεται η θέση εντόπισης του TSG.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που μελετήθηκαν στην ουροδόχο κύστη είναι κυρίως το p53 και το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb).

1.Γονίδιο p53

Το γονίδιο p53 εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος 17 (17p), είναι δε το συχνότερα ανευρισκόμενο μεταλλαγμένο γονίδιο στον ανθρώπινο καρκίνο (52). Κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, η οποία παρεμβαίνει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 (wild type) στη φάση G1 συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα ενώ κατά την έναρξη της φάσης αναδιπλασιασμού του DNA (φάση S) εισέρχεται στον πυρήνα όπου παραμένει για 3 περίπου ώρες για να συσσωρευθεί στη συνέχεια εκ νέου στο κυτταρόπλασμα. Μ' αυτό τον τρόπο προκαλεί καθήλωση των κυττάρων στη φάση G1, πριν δηλαδή το κύτταρο εισέλθει στη φάση S, παρέχοντας έτσι περισσότερο χρόνο για τη διόρθωση τυχόν γενετικής βλάβης. Η φυσιολογική wild type p53 πρωτεΐνη υπάρχει στα περισσότερα κύτταρα αλλά είναι ασταθής και έχει σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής (περίπου 20-30 λεπτά), με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Αντίθετα η μεταλλαγμένη (mutant) p53 έχει παρατεταμένο (περίπου 6 ώρες) χρόνο ημιζωής, με αποτέλεσμα τα επίπεδά της στα μεταλλαγμένα κύτταρα να είναι περίπου εκατονταπλάσια και να είναι ευκολότερη η ανίχνευσή της με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Η μεταλλαγμένη p53 όχι μόνο δεν έχει τη φυσιολογική δραστηριότητα της wt-p53, αλλά δρα και ως αναστολέας της, σχηματίζοντας μ' αυτή ένα σύμπλεγμα το οποίο δεν μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα όπου η wt-p53 δρα ανασταλτικά στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό .

Ειδικά για τον καρκίνο της κύστεως έχει δείχθει ότι η μετάλλαξη του p53 γονιδίου είναι συχνότερη σε όγκους υψηλού stage και grade καθώς και σε διηθητικούς όγκους. Είναι πιθανό ότι το p53 ίσως χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης κακού αποτελέσματος.

2.Γονίδιο Rb

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb), βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 13 (13q) και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p110 Rb, μοριακού βάρους 110 KD. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί τμήμα ενός ανασταλτικού της μεταγραφής του DNA συμπλέγματος, που ονομάζεται E2F, υφίσταται δε κυκλική αλλαγή στη φωσφορυλίωσή της ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Έτσι στη G₀ και G₁ είναι υποφωσφορυλιωμένη και συνδέεται με τον E2F, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου (Díaz De Ståhl, 2008). Αντίθετα στις φάσεις S και M υπερφωσφορυλιώνεται και αποδεσμεύεται από τον E2F, ο οποίος είναι πλέον ελεύθερος να συνδεθεί με τα παράγωγα διαφόρων γονιδίων που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η μετάλλαξη του Rb γονιδίου θα οδηγήσει σε απενεργοποίηση της p110 Rb και θα επιτρέψει την ευκολότερη είσοδο του κυττάρου στη φάση S, επιτείνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Στον καρκίνο της κύστεως η απώλεια του Rb γονιδίου έχει συσχετισθεί και με το στάδιο και με το grade του όγκου. Επίσης βρέθηκε ότι οι Rb-αρνητικοί όγκοι εξελίσσονται συχνότερα σε διηθητικούς απ' ότι οι Rb-θετικοί. Παρ' όλα αυτά απώλεια του Rb γονιδίου έχουν και οι επιφανειακοί όγκοι και μάλιστα σε ποσοστό από 7 έως και 50 % .

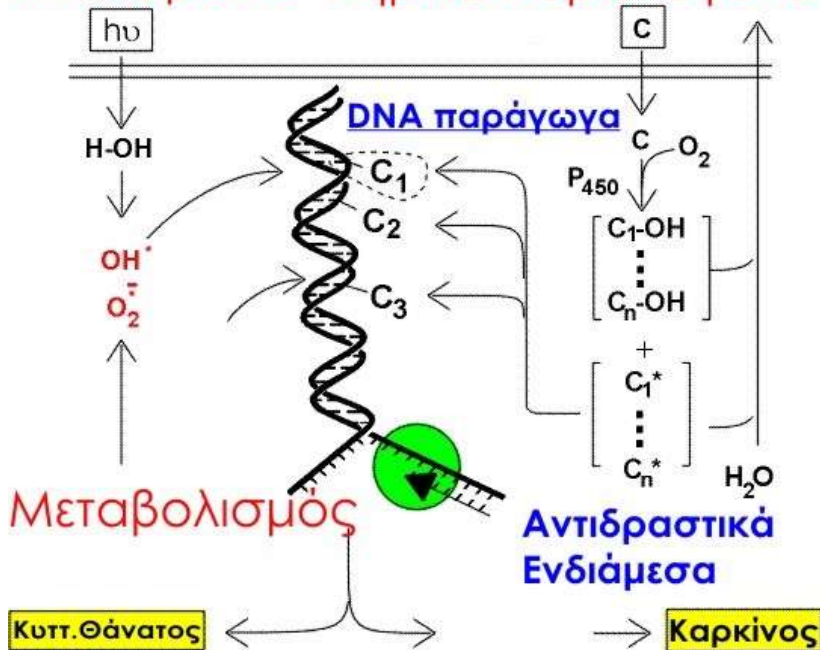
Οι μελέτες των τελευταίων ετών εστιάζονται και στην απώλεια γενετικού υλικού από το χρωματόσωμα 9. Αν και μοριακή ανάλυση αυτού του χρωματοσώματος είναι δύσκολη (διότι πολλές φορές λείπει ολόκληρο), εν τούτοις φαίνεται ότι εκεί βρίσκονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες p15 και p16, οι οποίες αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της p110 Rb και κατ' επέκταση τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σύμφωνα και με τα όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως. Απώλεια γενετικού υλικού από το χρωματόσωμα 9 ή και έλλειψή του, που οδηγεί σε έλλειψη των p15 και p16,

θεωρείται από πολλούς ως η αρχική γενετική βλάβη στην ανάπτυξη των low-grade (Ta) επιφανειακών όγκων της κύστεως. Αντίθετα το CIS και οι δυσπλασίες συνυπάρχουν συνήθως με μετάλλαξη του p53. Τα παραπάνω είναι ένδειξη ότι υπάρχουν δύο διαφορετικοί μοριακοί- γενετικοί δρόμοι για την ανάπτυξη επιφανειακού ή διηθητικού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Η ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

Σε επίπεδο γενετικού υλικού, η μετάλλαξη αποτελεί προϋπόθεση για τον μετασχηματισμό των κυττάρων και μπορεί να συμβεί αυτόματα ή με την επίδραση χημικών, φυσικών ή βιολογικών παραγόντων (Εικ 12)

Ακτινοβολία Χημικά Καρκινογόνα



Εικ.12 Προσβολή γενετικού υλικού από καρκινογόνους παράγοντες

ΚΑΠΝΙΣΜΑ: Το ενδιαφέρον έχει εστιασθεί στην 4-αμινομπιφαινύλη που βρίσκεται σε διάφορα βιομηχανικά χημικά και στον καπνό των τσιγάρων. Επειδή η ακετυλίωση του παράγοντα αυτού προάγει την έναρξη μιας διαδικασίας αποτοξίκωσης, οι μετρήσεις της ταχείας και βραδείας ακετυλίωσης των μεταβολιζομένων ουσιών, όπως η σουλφαμεθαζίνη και η καφεΐνη, έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο μετά από ανάλυση των ακετυλιωμένων ή μη κετυλιωμένων μεταβολιτών στα ούρα και το αίμα (Sun and Trihn, 2015)

Επειδή η N-ακετυλτρανσαφεράση 2 (NAT 2) φαίνεται ότι είναι το σπουδαιότερο ακετυλιωτικό ένζυμο, η έρευνα έχει εστιασθεί στη γενετική του σύνθεση. Άλλο ένζυμο που διμεθυλιώνει τις αρωματικές αμίνες, ενεργοποιώντας έτσι δυνητικά καρκινογόνα, είναι το κυτόχρωμα P-450 1A2 (CYP 1A2). Πιστεύεται ότι η εκτεταμένη ενεργοποίηση του ενζύμου αυτού στους άνδρες, τους προδιαθέτει σε μεγαλύτερη ενεργοποίηση καρκινογόνων και κατ' ακολουθίαν μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου της κύστεως σε σχέση με τις γυναίκες.

Άλλη ομάδα ενζύμων που η έλλειψη της ενοχοποιείται για καρκινογένεση είναι οι τρανσφερασες της γλουταθειόνης και ιδιαίτερα η S-τρανσφεράση MI της γλουταθειόνης. Οι καπνιστές τσιγάρων που έχουν έλλειψη του γονιδίου που

κωδικοποιεί το πιο πάνω ένζυμο έχουν διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως από ότι οι υπόλοιποι καπνιστές. Οι μη καπνιστές όμως που έχουν έλλειψη του γονιδίου αυτού εμφανίζουν παρόμοιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως.

ΧΡΟΝΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗ: Οι αερόβιοι οργανισμοί για την παραγωγή ενέργειας απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες, κυρίως HO[·], H₂O₂ και ONO₂⁻, οι οποίες είναι ισχυρά αντιδραστικές και προσβάλλουν το μόριο του DNA σχηματίζοντας οξειδωμένα παράγωγα (Jain et.al, 2015) Τα ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού, απελευθερώνουν κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση ελεύθερες ρίζες, αλλά και μεσολαβητές όπως ηλεκτρονιόφιλα εικοσανοειδή, που προέρχονται από υπεροξείδωση των λιπιδίων, τα οποία προσβάλλουν απευθείας το DNA Αν και η φλεγμονή με την καρκινογένεση έχουν αναγνωρισμένη σχέση από παλιά, συνδέθηκαν άμεσα με την παρατήρηση ότι υπερέκφραση του γονιδίου για το ένζυμο κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), αποτελεί πρώιμο γεγονός της καρκινογένεσης. Η COX-2, όπως επίσης και του NFκB έχει διαπιστωθεί πως συμμετέχουν στις διαδικασίες της καρκινογένεσης και ο ρόλος τους θα αναλυθεί εκτενέστερα σε ειδικές παραγράφους, δεδομένου ότι αποτελούν αντικείμενα μελέτης της παρούσας εργασίας.

ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΑΝΙΛΙΝΗΣ: είναι δυνητικά καρκινογόνα του ουροθηλίου. Άλλα καρκινογόνα για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως που έχουν αναφερθεί είναι: 2-ναφθυλαμίνη, βενζιδίνη, 2-αμινο-1-ναφθόλη, χλωριωμένοι αλιφατικοί υδρογονάνθρακες και διάφορες αλδεΐδες, όπως η ακρολεΐνη, που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες ελαστικών και υφαντουργίας. Εκτιμάται πως η επαγγελματική έκθεση ενοχοποιείται για το 20% των περιπτώσεων καρκίνου κύστεως στις ΗΠΑ (Letasiova et.al, 2012). Τα πιο συχνά καρκινογόνα της κύστεως είναι οι αρωματικές αμίνες, τα νιτρικά και τα νιτρώδη των τροφών, που ενεργοποιούνται από τη βακτηριακή εντερική χλωρίδα, θεωρούνται δυνητικά καρκινογόνα παράγοντες. Επίσης ενοχοποιούνται οι μεταβολίτες του αμινοξέος τρυπτοφάνη. Η ιονίζουσα ακτινοβολία, εκτός από τη συμβολή της στη δημιουργία ελεύθερων ριζών, είναι δυνατό να προκαλέσει απευθείας βλάβη στο DNA μέσω απλών ή διπλών θραύσεων στην έλικα του μορίου, αλλά και αλλαγών στις αζωτούχες βάσεις (ταυτομέρεια, απαμινώσεις) ή στη δεόξυριβόζη (θράυση)

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ : Η σχιστοσωμίαση της κύστεως συνοδεύεται με σημαντικά ποσοστά ανάπτυξης πλακώδους καρκίνου της κύστεως. Οι λοιμώξεις με μεταλλαγμένα στελέχη του ιού HPV συνοδεύονται με πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, του κόλπου, της ουρήθρας και του πέους. Η δράση του ιού στον καρκίνο της κύστεως δεν έχει τεκμηριωθεί. Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι DNA ιοί που προκαλούν κυρίως λοιμώξεις στα πλακώδη επιθήλια, οι οποίες μπορούν να εκδηλωθούν με καλοήθειες υπερπλαστικές διαταραχές, όπως ακροχορδών ή οξυτενή κονδυλώματα. Ο ιός είναι δυνατό να παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση χωρίς να πολλαπλασιάζεται, οπότε δεν εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις. Μελέτες αναφέρουν επιμόλυνση από τον ιό HPV στο 7-35% των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Είναι πιθανό κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια όπως c-myc και c-ras, να ενεργοποιούνται εξαιτίας της παρακαείμενης ενσωμάτωσης γενετικού υλικού του HPV. (Burgess, 2015).

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ: Το γεγονός πως δεν αναπτύσσεται καρκίνος σε όλους τους καπνιστές, ακόμα και στους πιο βαρείς, έχει χρησιμοποιηθεί ως επιχειρήματα κατά της ενοχοποίησης του καπνίσματος στην καρκινογένεση. Στην πραγματικότητα, η διαφορετική ευπάθεια ανά άτομο στους καρκινογόνους παράγοντες οφείλεται στη γενετική προδιάθεση. Επιπλέον, η χημική μεταβολή που προκαλείται στο DNA, αν

επιδιορθωθεί δεν θα καταλήξει σε μετάλλαξη. Η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA, ποικίλει κατά άτομο και έχει βρεθεί ελαττωμένη σε ασθενείς με καρκίνο κύστεως (Burgess, 2015).

Αιτιολογία

Χημικά καρκινογόνα

Η επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνα υπολογίζεται ότι ευθύνεται για το 20 % περίπου των καρκίνων της ουροδόχου κύστεως (Letasiova et.al, 2012). Ήδη από τον προηγούμενο αιώνα αναγνωρίστηκε η σχέση του καρκίνου της κύστεως με τις χρωστικές ανιλίνης. Το 1938, σε πειραματική μελέτη των Hueper και συν., αποδείχθηκε ο καρκινογενετικός ρόλος της 2-ναφθυλαμίνης, ενώ μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν την ισχυρή συσχέτιση της νόσου με διάφορες αρωματικές αμίνες, όπως βενζιδίνη, τολουιδίνη, 4-αμινοδιφαινύλη, 4-νιτροδιφαινύλη κ.λ.π. Αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση καρκίνου της κύστεως έχουν οι εργάτες των βιομηχανιών πετρελαίου, ελαστικών, δέρματος, χημικών και βαφών, αλλά υπάρχουν μελέτες στις οποίες αναφέρεται αυξημένος κίνδυνος σε οδηγούς αυτοκινήτων, σε υδραυλικούς ή ακόμη και σε τηλεφωνητές .

Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι η λανθάνουσα περίοδος από την έκθεση στον καρκινογόνο παράγοντα μέχρι την εμφάνιση της νόσου μπορεί να είναι πολύ μεγάλη, ακόμη και 30- 50 έτη. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται με την παραδοχή ότι ο αιτιολογικός παράγοντας πρέπει να δράσει αθροιστικά για να προκληθεί νόσος.

Εκτός από τις προαναφερθείσες χημικές ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, υπάρχουν και άλλες οι οποίες αποτελούν δυνητικούς καρκινογενετικούς παράγοντες. Οι μεταβολίτες της τρυπτοφάνης έχουν ενοχοποιηθεί ως προκαλούντες Ca ουροδόχου κύστεως και ως σχετιζόμενοι με υψηλό ποσοστό υποτροπών, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί κάτι τέτοιο σε πρόσφατες μελέτες. Επίσης ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου έχουν θεωρηθεί τα απαντώμενα σε διάφορες τροφές νιτρικά άλατα, καθώς και ο αλκυλιούντας παράγοντας χλωροναφαζίνη, του οποίου η χρήση εγκαταλείφθηκε γρήγορα.

Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες ουσίες, υπάρχουν άλλες οι οποίες θεωρούνται ότι αποτρέπουν την εμφάνιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Τέτοιες είναι η βιταμίνη Α και η β-καρωτίνη. Ατομα που προσλαμβάνουν με τις τροφές μικρές μόνο ποσότητες των ουσιών αυτών, έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, ενώ έχει αποδειχθεί και πειραματικά ότι η βιταμίνη Α μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη του καρκίνου που προκαλείται από χημικά καρκινογόνα (Letasiova et.al, 2012). Οι παρατηρήσεις αυτές αποτέλεσαν τη βάση για τη χρήση των ρητινοειδών ως δυνητικών χημειοπροστατευτικών παραγόντων σε ασθενείς με ιστορικό επιφανειακού όγκου της ουροδόχου κύστεως.

Κάπνισμα

Η ισχυρή σχέση του καπνίσματος με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχει πλήρως επιβεβαιωθεί. Υπολογίζεται ότι το κάπνισμα ευθύνεται για το 25-60 % των περιπτώσεων Ca κύστεως (Malats and Real, 2015). Οι καπνιστές διατρέχουν τετραπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης του καρκινώματος από τους μη καπνιστές και ο κίνδυνος φαίνεται ότι σχετίζεται με τον αριθμό των τσιγάρων, τη διάρκεια του καπνίσματος καθώς και με το βαθμό εισπνοής του καπνού. Αν και δεν έχει αναγνωρισθεί η υπεύθυνη για την ανάπτυξη του καρκίνου της κύστεως ουσία στους καπνιστές, εν τούτοις φαίνεται ότι εμπλέκονται οι νιτροζαμίνες, η 4-αμινοδιφαινύλη, η

ο-τολουϊδίνη, η 2-ναφθυλαμίνη καθώς επίσης και οι μεταβολίτες της τρυπτοφάνης, οι οποίοι βρέθηκαν σε αυξημένες ποσότητες στα ούρα καπνιστών. Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να διευκρινισθεί ο μηχανισμός της καρκινογένεσης απ' αυτές τις ουσίες και προς το σκοπό αυτό μελετώνται τα ένζυμα N-ακετυλοτρανσφεράση 2 (NAT 2), κυτόχρωμα P- 450 1 A2 (CYP 1A2), όπως και τα ένζυμα της οικογενείας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης και ιδίως η γλουταθειόνη S τρανσφεράση M1 (GSTM1). Το NAT 2 είναι το κυρίως υπεύθυνο ένζυμο για την αποδόμηση των αρωματικών αμινών και αναπτύσσεται σε άλλο τμήμα του κεφαλαίου αυτού. Το CYP 1 A2 απομεθυλιώνει αρωματικές αμίνες κι έτσι ενεργοποιεί δυνητικά καρκινογόνα. Το ένζυμο γλουταθειόνη S τρανσφεράση M1 αποδομεί το βενζοπυρένιο και κωδικοποιείται από το πολυμορφικό γονίδιο GSTM1, που εμφανίζεται στο 50 % του πληθυσμού (Letasiova et.al, 2012, Malats and Real, 2015). Η έλλειψή του σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως.

Οι ουσίες που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου, αποβαλλόμενες στα ούρα, προκαλούν (πριν την ανάπτυξη καρκίνου) αύξηση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων και υπερπλασία. Το γεγονός αυτό φαίνεται ότι είναι δόσοεξαρτώμενο και πιθανώς είναι μία ακόμη ένδειξη της καρκινογενετικής ικανότητας των ουσιών που περιέχονται στο τσιγάρο.

Η διακοπή του καπνίσματος φαίνεται ότι έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου της κύστεως, μείωση που πάντως είναι προοδευτική και μακροχρόνια. Υπολογίζεται ότι χρειάζονται τουλάχιστον 20 χρόνια από τη διακοπή του καπνίσματος ώστε ο σχετικός κίνδυνος να μειωθεί στα επίπεδα του μη καπνιστή και η περίοδος αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη για τον καρκίνο του πνεύμονα και τις καρδιαγγειακές νόσους.

Τσαΐ και καφές

Η κατανάλωση καφέ και τσαγιού είχε ενοχοποιηθεί από διάφορους ερευνητές ως αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως Δεν κατέστη όμως δυνατό να προσδιορισθεί η ακριβής σχέση των ουσιών αυτών με τον καρκίνο, τόσο επειδή γίνεται ευρεία κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο, όσο και επειδή η ταυτόχρονη κατανάλωση τεχνητών γλυκαντικών ουσιών αλλά και το κάπνισμα (στενά συνδεδεμένο με τον καφέ), αποτελούν επιπρόσθετους συγχυτικούς παράγοντες που αποτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Σε μεταγενέστερες πειραματικές μελέτες δεν αποδείχθηκε ότι η καφεΐνη μπορεί να ξεκινήσει ή να συντηρήσει και να επαυξήσει κάποια ογκογενετική διαδικασία στην ουροδόχο κύστη (Malats and Real, 2015). Σήμερα επομένως οφείλουμε να δεχθούμε ότι η κατανάλωση καφέ και τσαγιού δεν αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα του καρκίνου του ουροθηλίου.

Κατάχρηση αναλγητικών

Η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων αναλγητικών και ιδίως φαινακετίνης, η οποία έχει παρόμοια χημική δομή με την ανιλίνη, έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης TCC τόσο στην ουροδόχο κύστη όσο και στην νεφρική πύελο με μεγαλύτερη λανθάνουσα περίοδο για την ανάπτυξη όγκου στην κύσ Πειραματικά δείχθηκε ότι η φαινακετίνη προκαλεί σε πειραματόζωα αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού του ουροθηλίου και αυτή η παρατήρηση μπορεί να είναι πολύ σημαντική και για ανθρώπους που εκτέθηκαν σ' αυτόν τον παράγοντα. Πάντως τα πειραματικά δεδομένα είναι μεν ενδεικτικά αλλά όχι απολύτως αποδεικτικά της αιτιολογικής σχέσης της φαινακετίνης με τον καρκίνο.

Τεχνητά γλυκαντικά

Σε παλαιότερες πειραματικές μελέτες η νατριούχος σακχαρίνη και η κυκλαμάτη είχαν συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Οι μελέτες όμως αυτές δέχθηκαν έντονη κριτική και αμφισβήτηση. Επιπροσθέτως, επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο δεν απέδειξαν αυξημένο κίνδυνο στους καταναλίσκοντες τεχνητές γλυκαντικές ουσίες (Malats and Real, 2015).

Χρόνια κυστίτις και άλλες λοιμώξεις

Είναι γενικά παραδεκτό πως η χρόνια φλεγμονή της κύστεως, μικροβιακή και μη, μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Ειδικότερα:

Οι ασθενείς με μόνιμο καθετήρα έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πλακώδους καρκινώματος της ουροδόχου κύστεως. Υπολογίζεται ότι 2-10 % των παραπληγικών με μόνιμο καθετήρα θα αναπτύξουν Ca κύστεως, και περίπου το 80 % απ' αυτούς θα είναι εκ πλακώδους επιθηλίου.

Η σχιστοσωμίαση (βιλαρζίαση), η οποία οφείλεται στο παράσιτο *Schistosoma haematobium* και ενδημεί στις βόρειες ακτές της Αφρικής, θεωρείται αιτιολογικός παράγοντας του καρκινώματος εκ πλακώδους επιθηλίου (SCC). Έχει υπολογισθεί ότι το 70 % των περιπτώσεων Ca κύστεως σε πάσχοντες από σχιστοσωμίαση θα είναι SCC (Bellmunt et.al, 2009). Στην Αίγυπτο, όπου η σχιστοσωμίαση ενδημεί, το 40 % των περιπτώσεων καρκίνου της κύστεως είναι SCC, σε αντίθεση με το 5-10 % που παρατηρείται σε άλλες χώρες. Η εναπόθεση των ωαρίων του παρασίτου σε υποεπιθηλιακές θέσεις και η επακολουθούσα φλεγμονώδης αντίδραση, οδηγεί σε μετατροπή του φυσιολογικού μεταβατικού επιθηλίου σε πλακώδες, το οποίο έχει πολύ υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Ο μηχανισμός πρόκλησης καρκίνου στους ασθενείς με σχιστοσωμίαση, φαίνεται ότι εμπλέκει δύο παράγοντες: Πρώτον τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (αποτέλεσμα της έντονης φλεγμονώδους και αναγεννητικής διαδικασίας) ο οποίος παρέχει περισσότερες ευκαιρίες για αυτόματο γενετικό λάθος και καρκίνο και δεύτερον τη δημιουργία διαφόρων μεταλλαξιόνων ουσιών, όπως οι νιτροζαμίνες, με τις οποίες το ουροθήλιο έρχεται σ' επαφή μ' αυτές για μεγάλο χρονικό διάστημα. Φαίνεται ότι ο συνδυασμός αυτών των δύο παραγόντων είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη του καρκίνου στους ασθενείς αυτούς.

-) Οι υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις έχουν ενοχοποιηθεί ως αιτιολογικός παράγοντας στην ανάπτυξη του καρκίνου της κύστεως, ιδίως σε γυναίκες (Malats and Real, 2015). Το ίδιο ισχύει και για τους λίθους του ουροποιητικού που παραμένουν επί μεγάλο χρονικό διάστημα, πιθανόν επειδή προκαλούν τραυματισμό του ουροθηλίου. Η ουρολοιμώξη μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση εξ αιτίας της μετατροπής των νιτρικών των ούρων σε νιτροζαμίνες, αντίδραση η οποία καταλύεται από την αναγωγή των νιτρικών, ένα ένζυμο που παράγεται από πολλά βακτηρίδια.

-) Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφοροι ιοί (ρετροϊοί, παπιλλομαϊοί, ιοί της ομάδας του απλού έρπητα, αδενιοί) ως αιτιολογικοί παράγοντες του καρκίνου της κύστεως, χωρίς όμως να έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος τους. Ειδικότερα για τον HPV (Human Papilloma Virus), διάφορες μελέτες έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Μελετώντας με PCR το DNA όγκων της ουροδόχου κύστεως διάφοροι ερευνητές ανέφεραν ότι στο 7-35 % των καρκίνων συνυπήρχε και το DNA του HPV (3) και ότι ίσως ο ιός είναι ο αιτιολογικός παράγοντας των όγκων αυτών. Πάντως επειδή οι μελετηθέντες όγκοι ήταν όλοι διηθητικοί κι επειδή οι μελέτες δεν εστιάστηκαν και σε επιδημιολογικά δεδομένα, δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί ο ακριβής ρόλος του HPV στη δημιουργία του καρκίνου της κύστεως.

Κυκλοφοσφαμίδη

Η κυκλοφωσφαμίδη και οι συναφείς χημειοθεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους (Malats and Real, 2015)) και μάλιστα υπολογίζεται ότι οι θεραπευόμενοι με τους παράγοντες αυτούς έχουν 9πλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου από το γενικό πληθυσμό . Οι όγκοι στην πλειοψηφία τους είναι διηθητικοί τη στιγμή της διάγνωσης γι' αυτό και πολλοί συγγραφείς συνιστούν επιθετική θεραπεία από την αρχή (π.χ. κυστεκτομή). Ως υπεύθυνη ουσία, τόσο της αιμορραγικής κυστίτιδας (που είναι σοβαρή επιπλοκή της χορήγησης κυκλοφωσφαμίδης) όσο και του καρκίνου, θεωρείται ο μεταβολίτης ακρολεΐνη (36). Η ουσία Mesna θεωρείται προστατευτικός παράγοντας του ουροθελίου και πιστεύεται ότι μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης Ca κύστεως.

Ακτινοβολία της πυέλου

Γυναίκες που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχουν 2-4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως και μάλιστα χαμηλής διαφοροποίησης και τοπικά εκτεταμένου.

Κληρονομικότητα

Αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις “οικογενούς” εμφάνισης Ca κύστεως, δεν υπάρχουν επιδημιολογικές αποδείξεις κληρονομικότητας της νόσου. Επιπροσθέτως δεν έχει επιβεβαιωθεί (αν και έχει προταθεί) η ύπαρξη αυξημένου κινδύνου σε άτομα συγκεκριμένου υποτύπου HLA και φαινοτύπου ομάδων αίματος. Προτάθηκαν δύο τύποι κληρονομικότητας: ένας αυτοσωματικός επικρατών τύπος, που ευθύνεται για μικρό αριθμό περιστατικών και ένας πολυπαραγοντικός-πολυγονδιακός τύπος που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις γενετικών και περιβαλλοντολογικών παραγόντων .

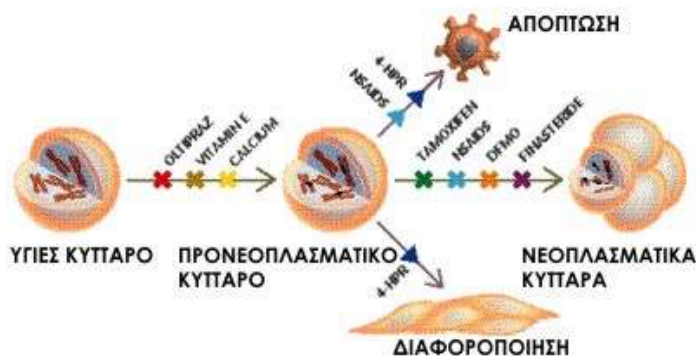
Από όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες φαίνεται ότι αυτοί που είναι κυρίως υπεύθυνοι για την ανάπτυξη καρκίνου στην ουροδόχο κύστη είναι οι αρωματικές αμίνες, γι' αυτό και η έρευνα έχει στραφεί στη μελέτη των μεταβολικών δρόμων αποδόμησής τους. Η απομάκρυνση των αρωματικών αμινών γίνεται με ακετυλίωση, διακρίνονται δε δύο ομάδες ατόμων: οι “γρήγορα ακετυλιώνοντες” και οι “αργά ακετυλιώνοντες” τις αρωματικές αμίνες. Ο Lower και συν. διατύπωσε την υπόθεση ότι οι ανήκοντες στην πρώτη κατηγορία δεν είναι τόσο επιδεκτικοί στην ανάπτυξη καρκίνου της κύστεως. Μεταγενέστερη επιδημιολογική μελέτη επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση και έδειξε ότι οι ανήκοντες στη δεύτερη κατηγορία έχουν 17 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης Ca κύστεως. Επιπροσθέτως το 96 % των ασθενών με Ca κύστεως που εκτίθενται σε αρωματικές αμίνες είναι “αργά ακετυλιώνοντες” . Το ένζυμο που είναι κυρίως υπεύθυνο για την ακετυλίωση των αμινών είναι το NAT 2 (N-ακετυλοτρανσφεράση 2). Είναι ένα πολυμορφικό ένζυμο, υπό την έννοια ότι η παραγωγή του κωδικοποιείται σε 6 διαφορετικές ποικιλίες αλληλίων, από τις οποίες όμως μόνο η μία παράγει ένζυμο με ταχεία δράση. Έτσι μόνο τα άτομα που είναι ομόζυγα για τα δύο “ταχεία” αλληλία είναι οι “γρήγορα” ακετυλιώνοντες. Οι υπόλοιποι είναι οι “αργά” ακετυλιώνοντες και βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στην ουροδόχο κύστη .

Η παραπάνω προσέγγιση μπορεί να αποβεί πολύ χρήσιμη στην προσπάθεια έγκαιρης αναγνώρισης εκείνων των καπνιστών που είναι πιθανότερο να αναπτύξουν Ca κύστεως

Χημειοπροφύλαξη

Χημειοπροφύλαξη ορίζεται ως η φαρμακολογική προσέγγιση που έχει στόχο να ανακόψει ή να αναστρέψει, είτε την έναρξη, είτε την πρόοδο της καρκινογένεσης και

επομένως να καθυστερήσει ή να εμποδίσει την ανάπτυξη καρκίνου (Jian et.al, 2015). Στόχος της χημειοπροφύλαξης είναι η μείωση της επίπτωσης του καρκίνου, με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες από τους χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες και με το μικρότερο δυνατό κόστος σε «υγιή» πληθυσμό. Με τη χρήση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων, φαρμακευτικών ή φυσικών, ενισχύουμε ενδογενείς βιολογικούς μηχανισμούς που προστατεύουν τον οργανισμό από την ανάπτυξη κλώνων νεοπλασματικών κυττάρων, γεγονός που τους καθιστά καθοριστικούς στην στρατηγική πρόληψης του καρκίνου. Η σπουδαιότητα της χημειοπροφύλαξης εδραιώθηκε με την επίδραση της ταμοξιφένης, ενός τροποποιητή των οιστρογονικών υποδοχέων, στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού, αλλά και στην υποστροφή προκαρκινικών αλλοιώσεων (Εικ.13). Ένας εκλεκτικός αναστολέας της COX-2, η celecoxib, χρησιμοποιείται πλέον στην αντιμετώπιση της Οικογενούς Αδενωματώδους Πολυποδίασης του παχέος εντέρου. Μεγάλη εντύπωση έχουν προκαλέσει και αποτυχημένες δοκιμές, όπως εκείνη που έδειξε πως η β-καροτίνη αυξάνει, αντί να μειώνει, τον κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα (Malats and Real, 2015). Οι τελευταίες υπογραμμίζουν τη σημασία που έχει η κατανόηση του μηχανισμού αντικαρκινογόνου δράσης ενός παράγοντα. Η πολυπαραγοντική φύση της καρκινογένεσης, ίσως επιβάλλει τη συνδυασμένη χημειοπροφύλαξη, που κατευθύνεται σε πολλαπλούς μοριακούς στόχους, ενώ ελαττώνεται ταυτόχρονα η τοξική δράση των επιμέρους συστατικών της. Μεγάλος αριθμός χημειοπροφυλακτικών σκευασμάτων βρίσκεται αυτή τη στιγμή υπό δοκιμή στις Φάσεις I, II και III κλινικών μελετών. Το πλεονέκτημα της προληπτικής παρέμβασης είναι ότι απευθύνεται σε φυσιολογικά ή προνεοπλασματικά κύτταρα σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.



Εικ13. Σημεία δράσης χημειοπροφυλακτικών φαρμάκων.

15. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν οι παράγοντες εκείνοι που αναστέλλουν την έναρξη της καρκινογένεσης δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ενεργοποιημένα καρκινογόνα παράγωγα, είτε ενισχύοντας επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA. Στη δεύτερη μεγάλη κατηγορία ανήκουν οι παράγοντες εκείνοι που αναστέλλουν την μετάπτωση, προαγωγή και εξέλιξη των προνεοπλασματικών κυττάρων σε νεοπλασματικά, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή καθοριστικών γονιδίων, υπεύθυνων για τη λειτουργία οδών μεταβολισμού, ανάπτυξης και διαφοροποίησης, είτε ενισχύοντας την οργάνωση του DNA σε νουκλεοσώματα, σταθεροποιώντας το γενετικό υλικό (Wu et.al, 2011). Επίσης στους χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες ανήκουν και τα ΜΣΑΦ (Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα) και οι αντιοξειδωτικές ουσίες. Η αναστολή της κυκλο-οξυγενάσης (COX-1-2), ένζυμο καταλυτικό της σύνθεσης των προσταγλανδινών

και της απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων από τα κοκκιοκύτταρα, καθυστερούν την ανάπτυξη κακοήθων όγκων και οδηγούν προκαρκινικές αλλοιώσεις σε υποστροφή. Η ανάπτυξη μάλιστα εκλεκτικών αναστολέων της επαγωγίσιμης ισομορφής COX-2 έχει αποτέλεσμα λιγότερες παρενέργειες σε σχέση με τα παραδοσιακά ΜΣΑΦ. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, εκτός από μεταλλαξιγόνες, παρουσιάζουν και προαγωγό δράση, αφού δρουν και ως σηματοδοτικά μόρια, όπως συμβαίνει με το NO. Συνεπώς, αντιοξειδωτικές ουσίες που τις δεσμεύουν, σαν αυτές που υπάγονται στην προηγούμενη κατηγορία (Αναστολείς ενεργοποίησης καρκινογόνων), περιορίζουν και τον τελευταίο ρόλο τους.

Χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως: Ασθενείς με θηλωματώδες νεόπλασμα ουροδόχου κύστεως, που έχουν επιτυχώς θεραπευτεί, με διουρηθρική εκτομή τους, εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μετάπτωσης του επιφανειακού νεοπλάσματος σε διηθητικό. Η χημειοπροφύλαξη, λοιπόν, ιδιαίτερα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως αναγνωρίζεται ως βασική και κλινική αναγκαιότητα, η πρόοδος της οποίας εξαρτάται από την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, με τη μέγιστη αποτελεσματικότητα και με ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες (Wu et.al, 2011). Το υψηλότερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν συστατικά της διαίτας, των οποίων η μακροχρόνια χορήγηση έχει αποδειχτεί εξαιρετικά ασφαλής. Η θεραπεία ασθενών, που υποβλήθηκαν σε διουρηθρική εκτομή νεοπλάσματος κύστεως με ρετινοϊκό οξύ, ένα ρετινοειδές που αποτελεί ανάλογο της βιταμίνης Α, για ένα χρόνο, είχαν δραματικά χαμηλότερο ποσοστό υποτροπών, γεγονός που προέκυψε από την παρατήρηση ότι μειωμένη έκφραση του υποδοχέα RAR-β (Retinoic Acid Receptor-β), των ρετινοειδών σε νεοπλάσματα ουροδόχου κύστεως και είναι αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού διαφοροποίησης.

Αμέτρητες επιδημιολογικές μελέτες κατέδειξαν πως η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών συνδέεται με μειωμένη επίπτωση καρκίνου. Η προστατευτική δράση διαίτας, που είναι πλούσια σε φρούτα και λαχανικά στην εμφάνιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως οφείλεται όχι μόνο στην περιεκτικότητά τους σε φυλικό οξύ αλλά και στις βιταμίνες με αντιοξειδωτική δράση που περιέχουν. Παρόλα αυτά επιδημιολογικά δεδομένα στηρίζουν αυτή την άποψη. Πολλές προοπτικές μελέτες κατέδειξαν ένα προστατευτικό ρόλο των βιταμινών όπως της β-καροτίνης, των Α, Β₆, C, και Ε. Συγκεκριμένα η Β₆ διασπά τους μεταβολίτες της τρυπτοφάνη στα ούρα, με αποτέλεσμα να ελαττώνει την πιθανότητα εμφάνισης ή υποτροπής νεοπλασμάτων ουροδόχου κύστεως. Τα φυτοοιστρογόνα είναι φυτικά συστατικά με ενδογενή οιστρογονική δράση. Τα ισοφλαβονοειδή, με σημαντικότερο εκπρόσωπο τη γενιστεΐνη, είναι η κυριότερη ομάδα και ανευρίσκονται σε προϊόντα σόγιας, φρούτα και λαχανικά. Οι λιγκάνες (lignans) και η κουμπεστρόλη ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες σε δημητριακά, μούρα, καρύδια και τριφύλλι, μπιζέλια, φασόλια, αντιστοίχως και έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό (Letasiova et.al, 2012, Malats and Real, 2015). Μελέτες υποστηρίζουν μία θετική συσχέτιση μεταξύ υψηλής κατανάλωσης φυτοοιστρογόνων και συχνότητας του νεοπλάσματος της κύστεως, άλλες δείχνουν μια προστατευτική δράση των φυσικών αυτών συστατικών, ενώ τέλος, υπάρχουν μελέτες που δεν αναδεικνύουν την ύπαρξη κάποιας επίδρασης της διατροφής στην ανάπτυξη καρκίνου της κύστεως.

Εξατομικευμένη θεραπεία: αποτελεί το μελλοντικό στόχο της ιατρικής και αποσκοπεί στην εφαρμογή της καταλληλότερης και με μικρότερες παρενέργειες θεραπείας σε κάθε ασθενή (the right drug for the right patient). Η ακριβής γνώση των ομοιοστατικών και παθολογικών μηχανισμών του οργανισμού σε συνδυασμό με την ιστοπαθολογική εξέταση των χειρουργικών παρασκευασμάτων ογκολογικών επεμβάσεων, δίνει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το κύτταρο προέλευσης, τον ιστολογικό τύπο, το στάδιο και το βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος (Bellmunt et.al, 2009). Ωστόσο, συχνά ασθενείς με ίδιο τύπο καρκίνου και παρόμοιο στάδιο εμφανίζουν

διαφορετική έκβαση και διαφορετική ανταπόκριση στο ίδιο θεραπευτικό σχήμα. Με δεδομένη την πολυσταδιακή φύση της καρκινογένεσης, θεωρείται απίθανο η έκβαση των νεοπλασμάτων να συνδέεται με την έκφραση ενός ή λίγων μορίων. Για το λόγο αυτό, με τη βοήθεια πολλών, πλην όμως πολύπλοκων, σύγχρονων τεχνικών εισέρχεται πλέον δυναμικά στο χώρο της ιατρικής η έννοια της ολιστικής –συστηματικής ιατρικής, σύμφωνα με την οποία ένα σύστημα είναι μια ομάδα επί μέρους στοιχείων (υποσυνόλων) τα οποία στο σύνολό τους διαντιδρώντα και αλληλοεξαρτώμενα διαμορφώνουν μια πολύπλοκότερη ενιαία οντότητα. Συνεπώς η πρόκληση της κατανόησης της βιολογικής πολυπλοκότητας είναι αυτή της αποκρυπτογράφησης του τρόπου λειτουργίας δυναμικών βιολογικών δικτύων και με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η κατανόηση της πολύπλοκης διαδικασίας της καρκινογένεσης, η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια και σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων. Αυτά τα δεδομένα οδήγησαν τους ερευνητές στην αναζήτηση θεραπευτικών σκευασμάτων που αλληλεπιδρούν με μόρια-κεντρικούς ρυθμιστές της διαδικασίας της καρκινογένεσης, εισάγοντας την έννοια της στοχευμένης θεραπείας (targeted therapy). Ένα από τα πρώτα παραδείγματα στοχευμένης θεραπείας αποτελεί η χρήση της ιματινίμπης στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και τους στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού συστήματος. Πρόκειται για μόριο που αναστέλλει τη δράση υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, όπως οι Abl και c-kit, οι οποίοι είναι συνεχώς ενεργοποιημένοι, σε αυτά τα νεοπλάσματα, και ευθύνονται για την ανάπτυξη τους. Επομένως, υπό το πρίσμα των εφαρμογών χημειοπρόληψης και εξατομικευμένης θεραπείας, η αποσαφήνιση του ρόλου των οιστρογονικών υποδοχέων στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι μείζονος σημασίας. SERMs – εκλεκτικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές αποτελούν το μέλλον για την αντιμετώπιση νεοπλασιών, την ανακάλυψη στοχευμένων θεραπειών και την αντιμετώπιση αντίστασης στα χορηγούμενα χημειοθεραπευτικά.

Άλλη ομάδα ενζύμων που η έλλειψη της ενοχοποιείται για καρκινογένεση είναι οι τρανσφερασες της γλουταθειόνης και ιδιαίτερα η S-τρανσφεράση MI της γλουταθειόνης. Οι καπνιστές τσιγάρων που έχουν έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί το πιο πάνω ένζυμο έχουν διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως από ότι οι υπόλοιποι καπνιστές. Οι μη καπνιστές όμως που έχουν έλλειψη του γονιδίου αυτού εμφανίζουν παρόμοιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως.

16.ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Οι κυτταρικές σειρές αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη συμπεριφοράς κυττάρων σε καλλιέργεια, αλλά και αποτελούν πολύ καλό υλικό για την μελέτη γονιδίων, πιο συγκεκριμένα γονιδιακή έκφραση, πολυμορφισμούς οι οποίοι είναι δυνατό να αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση μιας νόσου, αλλά χρησιμοποιούνται ακόμη και για μελέτη πρωτεϊνών καθώς είναι δυνατό να εκφράσουν πρωτεΐνες ενδιαφέροντος κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Τα προϊόντα αυτών των πειραμάτων, δηλαδή οι πρωτεΐνες μπορούν στην συνέχεια να μελετηθούν για τις ιδιότητές τους και την συσχέτισή τους με την όποια νόσο.

Όπως και σε κάθε τύπο καρκίνου, έτσι και στον καρκίνο του ουροθηλίου υπάρχουν διάφορες κυτταρικές σειρές οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση και εξεύρεση γονιδίων ενδιαφέροντος και λειτουργιών διάφορων βιολογικών μονοπατιών τα οποία και σχετίζονται με την πρόοδο της νόσου ή με την αντίσταση στην θεραπεία ή με άλλα χαρακτηριστικά ενδιαφέροντος.

Κατά αυτό τον τρόπο, μερικές κυτταρικές σειρές του καρκίνου του ουροθηλίου έχουν δημιουργηθεί σε αρουραίους καθώς είναι σαφώς πιο εύκολη η πρόσβαση και ο χειρισμός τρωκτικών σε σχέση με τον άνθρωπο από χρηστικής πλευράς αλλά και από

ηθικής πλευράς. Επίσης η δημιουργία κυτταρικών σειρών στην περίπτωση του ουροθηλιακού καρκίνου από τρωκτικά κρίνεται και απαραίτητη εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας αυθόρμητων και ξαφνικών μεταλλάξεων την οποία εμφανίζουν τα κύτταρα των τρωκτικών σε σχέση με τα ανθρώπινα κύτταρα (Johnson et.al, 1985). Πιο συγκεκριμένα τα ουροθηλιακά κύτταρα από αρουραίους έχουν χρησιμοποιηθεί για να δείξουν οι επιστήμονες ότι ειδικά μόρια όπως για παράδειγμα το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι δυνατό να προκαλέσει καρκινογένεση με την μετροπή φυσιολογικών κυττάρων αλλά και κυττάρων με χαμηλό καρκινικό δυναμικό σε καρκινικά κύτταρα (Knowles and Hani, 1986, Azuma et.al, 1990, Okamoto et.al, 1996). Παρά την χρήση αυτών των κυττάρων σε έρευνες που έχουν δημοσιευτεί σε έγκριτα περιοδικά, η συνεχής χρήση αυτών των σειρών και περισσότερο η χρήση τους στον αντικατοπτρισμό παθήσεων στον άνθρωπο, όπως οι κακοήθειες, αρχίζουν και λαμβάνουν ολοένα και περισσότερες αρνητικές ανασκοπήσεις και γνώμες .

Όσο αφορά στις κυτταρικές σειρές του ουροθηλίου οι οποίες προέρχονται από τον άνθρωπο και πιο συγκεκριμένα από καρκινικά κύτταρα του ουροθηλίου, υπάρχουν αρκετές οι οποίες πλέον χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα διότι θεωρούνται ότι αντικατοπτρίζουν σε μεγάλο βαθμό την αθανασία που τα καρκινικά κύτταρα επιδεικνύουν και στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Κατά αυτό τον τρόπο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έχουν δημιουργηθεί και αξιολογηθεί οι οποίες αντιπροσωπεύουν όγκους διαφορετικών σταδίων και βαθμίδων της νόσου με μεγάλη πιστότητα ως προς την ταυτότητα του αρχικού όγκου από τον οποίο προέρχονται (Masters et.al, 1986). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων σειρών αποτελούν κυτταρικές σειρές οι οποίες προκάλεσαν καρκίνο σε γυμνά από ανοσοποιητικό σύστημα ποντίκια και σε ανθρώπινα οργανοτυπικά συστήματα και μάλιστα με τα χαρακτηριστικά (σταδιο κλπ) του όγκου από τον οποίο προήλθαν (Booth et.al, 1997, Gunther et.al, 1999, Hoffmann et. Al, 1999, Booth et.al, 2002).

Παρά τα όσα αναφέρονται κατά καιρούς σε ανάλογες έρευνες που σχετίζονται με κυτταρικές σειρές ελάχιστες είναι εκείνες οι οποίες μπορούν να παίξουν τελικά σημαντικό ρόλο στο ερευνητικό αυτό πεδίο. Από εκείνες που συναντά κανείς συχνά στην βιβλιογραφία, μια σημαντική κυτταρική σειρά είναι η RT4 που είναι από non invasive G1 pTα όγκο που είναι και η πιο συνηθέστερη μορφή όγκου στον τύπο αυτό καρκίνου. Παρά όλα αυτά όμως εξακολουθούν οι κυτταρικές σειρές και στον τύπο αυτό καρκίνου να αποτελούν πολύ σημαντικό υλικό για την κατανόηση της συμπεριφοράς του ουροθηλιακού καρκίνου. Ανάλυση τέτοιων σειρών ανέδειξε την λειτουργική σημασία καθώς και την σχέση μεταξύ των μονοπατιών pRb και p53 στην ανάπτυξη του οροθηλιακού καρκίνου και απέδειξαν πόσο σημαντική είναι η απενεργοποίηση μονοπατιών στην παρεμπόδιση του ουροθηλιακού καρκίνου (Sarkar et.al, 2000).

Σε γενικές γραμμές βέβαια τα κύτταρα των σειρών του ουροθηλίου είναι ανώμαλα και παρουσιάζουν πολλές διαφοροποιήσεις στον καρυότυπό τους αλλά και βρίθουν γενετικών ανωμαλιών που είναι δυνατό να είναι χρήσιμες στην μελέτη του καρκίνου του ουροθηλίου, σε πολλές περιπτώσεις συγκεντρώνουν γενετικές διαφοροποιήσεις, λόγω γενετικών πιέσεων οι οποίες προέρχονται από εκτεταμένη καλλιέργεια, με αποτέλεσμα τα δεδομένα αυτά να έρχονται σε σύγκρουση με δεδομένα τα οποία έχουν ήδη εξαχθεί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί κυτταρική σειρά από καρκίνο του ουροθηλίου η οποία σε μία μελέτη εμφανίζεται ως ακτινοευαίσθητη (Ribeiro et.al, 1997), σε άλλη μελέτη εμφανίζεται ως ακτινοανθεκτική (McIlWraith et.al, 1994) ενώ σε άλλη μελέτη δεν συσχετίζεται καθόλου με αντίσταση σε καμμία θεραπεία (Chang and Lai, 2001).

Επίσης η περίπτωση της μετάδοσης επιμόλυνσης μεταξύ των κυτταρικών σειρών είναι δυνατό να αλλοιώσει τα αποτελέσματα και γι' αυτό το λόγο οι κυτταρικές σειρές που

χρησιμοποιούνται θα πρέπει να έχουν πιστοποίηση από την αρμόδια κυτταρική τράπεζα από την οποία προέρχονται (Masters et.al, 2001).

Αναφορικά, ενδεικτικές κυτταρικές σειρές του καρκίνου του ουροθηλίου αποτελούν και οι:

- 1) RT4. (Duggan et.al, 2001)
- 2) UM-UC-3 (Bellet et.al, 1997)
- 3) ECV 304 (Collins et.al, 2000)
- 4) HT1197 (Groves et.al, 1984).

17. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K/AKT

Η κυτταρική οδός μεταγωγής μοριακών σημάτων (κυτταρικό μονοπάτι) PI3K/Akt αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας στον καρκίνο τα τελευταία χρόνια (Luo 2003, Yap 2008). Η διαταραγμένη/συνεχής ενεργοποίηση (constitutive activation) της συγκεκριμένης οδού δίνει πλεονέκτημα επιβίωσης στα κύτταρα μέσω επαγωγής του κυτταρικού κύκλου και αναστολής της απόπτωσης και έχει συσχετισθεί με την καρκινογένεση, την αύξηση του όγκου, την αγγειογένεση, τη μεταστατική νόσο και την ανθεκτικότητα στη θεραπεία σε διάφορους τύπους κακοήθειας (Altomare et.al, 2005, Jiang et.al, 2008). Η φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης Akt κατέχει κεντρικό ρόλο στην αλληλουχία των γεγονότων που έπονται της ενεργοποίησης της PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) και οδηγεί σε ρύθμιση της λειτουργίας πληθώρας άλλων μορίων-στόχων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό, την αύξηση, τη διαφοροποίηση, την ομοιόσταση και την επιβίωση του κυττάρου (Matheny et.al, 2009, Chang et.al, 2003, Liang et.al, 2003, Jiang 2008). Η παρουσία διαταραγμένης/συνεχούς ενεργοποίησης (constitutive activation) της οδού PI3K/Akt έχει περιγραφεί σε μία πληθώρα κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένων των αιματολογικών νεοπλασιών (Altomare et.al, 2005, Robertson et.al, 2005, Tokunaga et.al, 2006, Ríos-Moreno et.al, 2011, Pene et.al, 2002, Park et.al, 2010). Η βιολογική σημασία της πρωτεΐνης Akt στη λεμφοματογένεση έχει αποδειχθεί πειραματικά σε μοντέλο ποντικού (Wendel et.al, 2004).

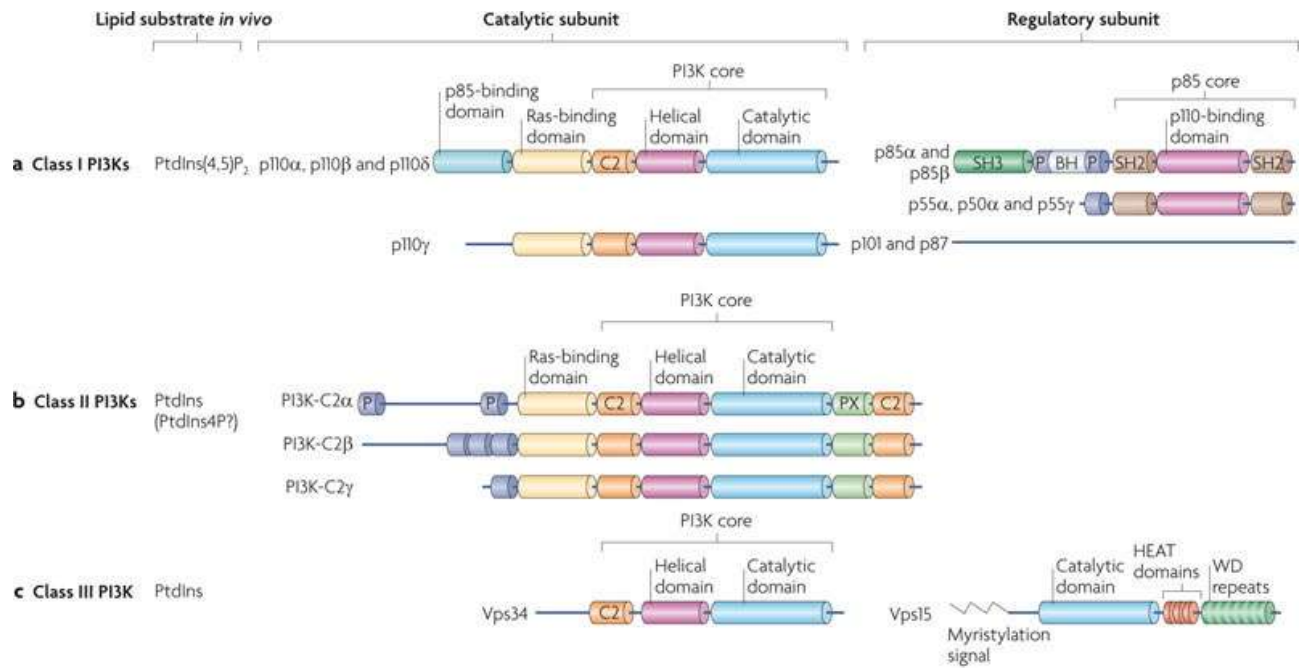
Η πρωτεΐνη PI3K

Η οικογένεια των πρωτεϊνών PI3K περιλαμβάνει ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις παραγωγής ειδικών φωσφολιπιδίων ινοσιτόλης (Vanhaesebroeck et.al, 1999). Τα ένζυμα αυτά κατατάσσονται σε τρεις κύριες τάξεις (classes) I, II και III ανάλογα με την δομή και την ειδικότητά τους (Cantley et.al, 2002, Vanhaesebroeck et.al, 2010). Εξ αυτών, η σαφώς πιο μελετημένη τάξη είναι η I και κυρίως η IA, η οποία εμφανίζει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την καρκινογένεση (Jiang et.al, 2008, Park et.al, 2010). Τα μέλη των PI3- κινασών (PI3Ks) της τάξης IA (PI3K α , PI3K β και PI3K δ) είναι ετεροδιμερή τα οποία αποτελούνται από μία καταλυτική υπομονάδα των 110 kD και μία ρυθμιστική υπομονάδα των 85, 55 ή 50 Kd γενικότερα γνωστή ως p85 (Geering et.al, 2007). Η καταλυτική υπομονάδα απαντάται σε τρεις ισομορφές p110 α , p110 β και p110 δ , οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια PIK3CA, PIK3CB και PIK3CD αντίστοιχα (Thorpe et.al, 2015). Η ρυθμιστική υπομονάδα p85 υπάρχει σε πέντε ισόμορφα p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α , p50 α (Vanhaesebroeck et.al, 1999, Hawkins et.al, 2006). Το γονίδιο PIK3R1 κωδικοποιεί για τις ισομορφές p85 α , p55 α και p50 α και τα γονίδια PIK3R2 και PIK3R3 για τις p85 γ και p55 γ αντίστοιχα.

Οι PI3- κινάσες της τάξης I έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούν την πρωτεΐνη Akt στα κύτταρα μέσω της δημιουργίας 3'-φωσφορυλιωμένων παραγώγων φωσφατιδυλινοσιτόλης (Vanhaesebroeck et.al, 2010). Η φωσφατιδυλινοσιτόλη

(phosphatidylinositol-PtdIns) είναι λιπίδιο που αποτελείται από έναν κεντρικό πυρήνα γλυκερόλης, ο οποίος έχει συνδεδεμένα δύο λιπαρά οξέα στις θέσεις 1 και 2 και ένα 1-φωσφορικό άλας ινοσιτόλης στη θέση 3. Στα κύτταρα όλα τα ελεύθερα υδροξύλια του δακτυλίου ινοσιτόλης των PtdIns εκτός από αυτά στις θέσεις 2 και 6 μπορούν να φωσφορυλιωθούν σε διάφορους συνδυασμούς. Το φωσφορυλιωμένο παράγωγο των PtdIns ονομάζεται φωσφοϊνοσιτίδιο 30 (phosphoinositide-PI) (Vanhaesebroeck 2010). Τα κύτταρα σε ηρεμία περιέχουν βασικά επίπεδα της 3'- φωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PtdIns3P), αλλά σχεδόν καθόλου (3,4- διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη) [PtdIns(3,4)P2] και (3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη) [PtdIns(3,4,5)P3], οι οποίες αποτελούν τα κύρια προϊόντα της τάξης I των PI3Ks (Engelman et.al, 2006, Hennessy et.al, 2005).

Ερεθίσματα τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση τυροσινικών κινασών οδηγούν στη συνέχεια στην ενεργοποίηση των PI3Ks της τάξης IA (Engelman et.al, 2006, Hennessy et.al, 2005). Αυτή η ενεργοποίηση γίνεται μέσω μεμβρανικών υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης (Receptor tyrosine kinases-RTKs) ή μέσω τυροσινικών κινασών που δεν είναι μεμβρανικοί υποδοχείς (non-receptor tyrosine kinases) [όπως είναι οι κινάσες 31 της οικογένειας Src, Syk ή JAK (Janus kinase)] (Vanhaesebroeck et.al, 2010, Günzl et.al, 2008). Στην κατηγορία των RTKs ανήκουν υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, ιντερφερόνης και ιντεγκρινών. Οι τυροσινικές κινάσες που δεν είναι μεμβρανικοί υποδοχείς εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των PI3Ks μέσω υποδοχέων των B- και T- κυττάρων, B cell receptor (BCR), T cell receptor (TCR), υποδοχέων κυτοκινών και άλλων μορίων ενεργοποιητών (Vanhaesebroeck et.al, 2010, Günzl 2008). Παρομοίως η ενεργοποίηση ορισμένων, σπειροειδούς μορφολογίας, υποδοχέων οι οποίοι ενώνονται με ετεροδιμερείς πρωτεΐνες G οδηγεί σε ενεργοποίηση των PI3K της τάξης IB (Hirsch et.al, 2007, Momose et.al, 2003). Μετά την ενεργοποίησή της, η PI3K μετατρέπει την 4,5- διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PtdIns(4,5)P2 σε PtdIns(3,4,5)P3 η οποία είναι απαραίτητη για την φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt. Ειδικές φωσφατάσες αντιτίθενται στη δράση της PI3K. Συγκεκριμένα, η φωσφατάση PTEN (Phosphatase and tensin homologue) αποφωσφορυλιώνει την PtdIns(3,4,5)P3 στη θέση 3', ενώ οι φωσφατάσες SHIP (SH2-containing-inositol phosphatase) αποφωσφορυλιώνουν την PtdIns(3,4,5)P3 στη θέση 5' (Georgescu et.al, 2010). Σωματικές μεταλλάξεις και/ή ενίσχυση του γονιδίου PIK3CA, καθώς και σωματικές μεταλλάξεις – συμπεριλαμβανομένης της απαλοιφής (deletion) – του γονιδίου PIK3R1 έχουν περιγραφεί σε διάφορους τύπους κακοήθειας, και οδηγούν σε διαταραγμένη/συνεχή ενεργοποίηση (constitutive activation) της κινάσης PI3K (Samuels et.al, 2010, et.al, Jiang 2008). Μια σχηματική απεικόνιση των ισόμορφων της PI3K απεικονίζεται στην εικόνα 14 (Vanhaesebroeck et.al, 2010).



Εικ.14. Μια σχηματική απεικόνιση των ισόμορφων της PI3K

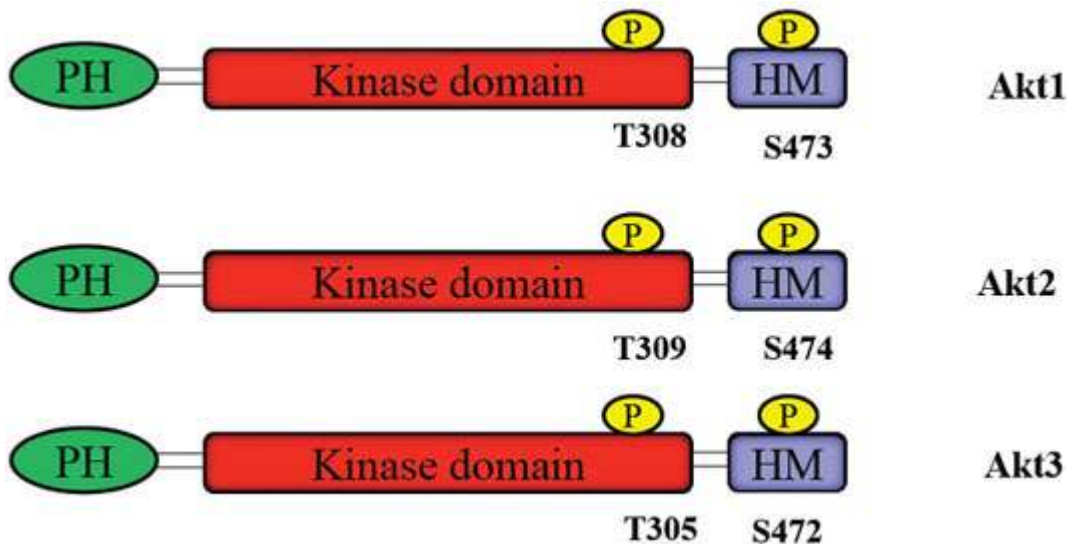
Η πρωτεΐνη Akt

Η Akt – γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B (Protein kinase B-PKB) - είναι μία κυτταρική πρωτεΐνη μεγέθους 57 Kd, μέλος της οικογένειας AGC των πρωτεϊνικών κινασών, και έχει δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Matheny et.al, 2009, Osaki et.al, 2004). Σήμερα θεωρείται μία από τις σημαντικότερες πρωτεϊνικές κινάσες των ανώτερων ευκαρυωτικών και της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας. Αρχικά ανακαλύφθηκε το ογκογονίδιο της το 1987 και μετέπειτα το 1991 απομονώθηκε η ίδια η πρωτεΐνη από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες (Bellacosa et.al, 1991, Coffe et.al, 1991, Jones et.al, 1991). Οι δύο ομάδες αναγνώρισαν την κινάση λόγω της παρόμοιας δομής της (Homology) με τις πρωτεϊνικές κινάσες C και A (protein kinases PKC and PKA) (Coffe et.al, 1991, Jones et.al, 1991). Η τρίτη ομάδα την αναγνώρισε ως το προϊόν του ογκογονιδίου v-akt του ιού AKT8, ο οποίος απομονώθηκε από ένα T κυτταρικό λέμφωμα σε τρωκτικά. (Bellacosa et.al, 1991).

Στα θηλαστικά απαντώνται τρεις κυρίως ισομορφές της Akt, η Akt1, η Akt2 και η Akt3 οι οποίες κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια (PKBα για την Akt1 στον γονιδιακό επίτοπο 14q32, PKBβ για την Akt2 στον επίτοπο 19q13.1-13.2 και PKBγ για την Akt3 στον επίτοπο 1q44 αντίστοιχα). (Matheny et.al, 2009, Osaki et.al, 2004) Κάθε μία ισομορφή αποτελείται από τρία τμήματα: α) ένα αμινοτελικό άκρο με δομή παρόμοια με της πλεκστρίνης [Pleckstrin homology (PH) domain], β) μία κεντρική καταλυτική περιοχή κινάσης (A-loop) και γ) ένα καρβοξυτελικό άκρο που περιέχει μία υδρόφοβη περιοχή με δομή παρόμοια με άλλες AGC κινάσες. Μέσω της σύνδεσης της PH περιοχής (domain) της Akt με την PtdIns(3,4,5)P3, η Akt μετακινείται επί της κυτταρικής μεμβράνης όπου αλλάζει η στερεοχημική της διαμόρφωση και φωσφορυλιώνεται στην περιοχή της A-loop και στην περιοχή HD 33 από την PDK1 [Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1] και από το σύμπλοκο mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) αντίστοιχα (Matheny et.al, 2009, Sarbassov et.al, 2005). Υπό ειδικές συνθήκες η φωσφορυλίωση της Akt στην περιοχή HD μπορεί να

ευοδωθεί και από άλλους παράγοντες όπως η DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (DNA-dependent protein kinase – DNA-PK), τα lipid raft-associated elements, καθώς και μέσω αυτοφωσφορυλίωσης (Bozulic et.al, 2008, Hill et.al, 2002). Εντούτοις, το σύμπλοκο mTORC2 είναι το κυρίως υπεύθυνο για την HD φωσφορυλίωση σε συνθήκες όπου η ενεργοποίηση της Akt εξαρτάται από αυξητικούς παράγοντες (Matheny et.al, 2009). Όσον αφορά την Akt1 ισομορφή, η φωσφορυλίωση στη θέση της Ser473 θεωρείται απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση του μορίου (Matheny et.al, 2009). Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση στη θέση της Thr308 προηγείται της φωσφορυλίωσης στη θέση της Ser473, προς το παρόν εντούτοις ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης της Akt χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Sarbassov et.al, 2005, Liao et.al, 2010, Matheny et.al, 2009). Η αποφωσφορυλίωση της Akt πραγματοποιείται από δύο φωσφατάσες, τις PHLPP1 και PHLPP2 (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 και 2), η δράση των οποίων σχετίζεται με το είδος της ισομορφής της Akt. Ενίσχυση των γονιδίων των Akt1 και Akt2 ισομορφών, αυξημένη έκφραση του mRNA της Akt3, καθώς και μία συγκεκριμένη σωματική μετάλλαξη στην περιοχή PH της Akt1 (E17K) έχει αναφερθεί σε κάποιες περιπτώσεις κακοηθειών (Jiang et.al, 2008, Carptenet.al, 2007). Η ενεργοποίηση της Akt στον καρκίνο έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με αντίσταση στην χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία (Jiang et.al, 2008).

Τα ισόμορφα της Akt απεικονίζονται στην εικόνα 15 (Viglietto et.al, 2011).

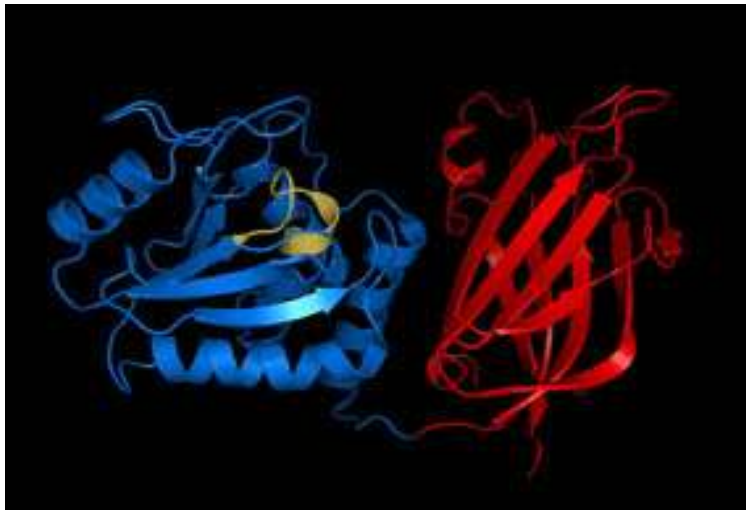


Εικ.15 Τα ισόμορφα της Akt

Η πρωτεΐνη PTEN

Η φωσφατάση PTEN είναι μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 403 αμινοξέα και ανήκει στην οικογένεια των φωσφατασών των πρωτεϊνών τυροσίνης (protein tyrosine

phosphatases).Εντούτοις, η κύρια δράση της είναι είναι η αποφωσφορυλίωση των 3'-PIs λιπιδίων (Downes et.al, 2001). Η PTEN παίζει καίριο ρόλο στο κυτταρικό μονοπάτι PI3K/Akt καθώς αντιτίθεται στη δράση της PI3K καταλύοντας τη μετατροπή της PtdIns(3,4,5)P3 σε PtdIns(4,5)P2 και αποτελεί τον κύριο αναστολέα της κυτταρικής οδού PI3K/Akt. (Downes 2001, Lian et.al, 2005). Η φωσφορυλιωμένη μορφή της PTEN αποτελεί την ανενεργή μορφή της φωσφατάσης, ενώ η αποφωσφορυλίωση αυτής οδηγεί σε ενεργοποίηση αντίστοιχα (Gericke et.al, 2006). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την PTEN είναι γνωστό με διάφορες ονομασίες PTEN/MMAC1/TEP1 (Steck et.al, 1997). Πρόκειται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στον χρωμοσωμικό τόπο 10q23 και παρουσιάζει συχνά απενεργοποίηση μέσω μεταλλάξεων σε διάφορους τύπους καρκίνου. Σήμερα αναγνωρίζεται ως το δεύτερο κατά σειρά συχνότητας ογκοκατασταλτικό γονίδιο με μεταλλάξεις στον καρκίνο μετά το TP53 (Georgescu et.al, 2010). Μεταλλάξεις του PTEN έχουν περιγραφεί σε κακοήθειες επιθηλιακής και μεσεγχυματογενούς αρχής, αλλά και σε αιματολογικές κακοήθειες (Byun et.al, 2003, Harima et.al, 2003, Saito et.al, 2004) Επίσης, ασθενείς με οικογενή σύνδρομο που προδιαθέτουν σε νεοπλασίες φέρουν συχνά μεταλλάξεις του PTEN στη σειρά των γεννητικών τους κυττάρων (Harima et.al, 2003). Εκτός από τις γονιδιακές διαταραχές απώλεια της λειτουργίας της φωσφατάσης PTEN μπορεί να συμβεί και με άλλους μηχανισμούς όπως η μεθυλίωση του προαγωγέα του γονιδίου, η παρέμβαση micro-RNAs στον μεταφραστικό μηχανισμό με ή χωρίς ταυτόχρονη απώλεια PTEN ψευδογονιδίων και φυσικά η φωσφορυλίωση της PTEN, αλλά και μεταβολές που αφορούν άλλες σχετιζόμενες με αυτήν πρωτεΐνες. (Kim 2010, Polisenio et.al, 2010, Molina et.al, 2010). Η απώλεια της λειτουργίας της PTEN οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγωγής σημάτων μέσω της οδού PI3K/Akt (Osaki et.al, 2004). Η κρυσταλλική δομή της PTEN εμφανίζεται στην εικόνα 16 (Lee et.al, 1999)



Εικ.16. Η κρυσταλλική δομή της PTEN

Το μονοπάτι PI3K/Akt

Η ενεργοποίηση του κυτταρικού μονοπατιού PI3K/Akt επηρεάζει είτε άμεσα, είτε έμμεσα τη λειτουργία πολλών άλλων μορίων-στόχων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την αύξηση, καθώς και την επιβίωση του κυττάρου.

Σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, οι κινάσες PI3K ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς με κατάλοιπο κινάσης-τυροσίνης (RTKs) καθώς και κινάσες τυροσίνης που δεν αποτελούν υποδοχείς. Στους υποδοχείς με κατάλοιπο κινάσης-τυροσίνης (RTKs) ανήκουν ο EGFR, ο PDGFR, ο FGFR, ο IGF-1R, ο VEGFR, οι υποδοχείς

ιντερφερονών και οι υποδοχείς ιντεγκρινών. Οι υποδοχείς με κατάλοιποκινάσης-τυροσίνης αλληλεπιδρούν με τη ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3Kκινάσης ενώ η πρωτεΐνη Ras αλληλεπιδρά απ' ευθείας με την καταλυτική υπομονάδα p110 της κινάσης PI3K. Αφού προσδεθούν οι αυξητικοί παράγοντες στους αντίστοιχους υποδοχείς, ενεργοποιούνται οι τελευταίοι και αλληλεπιδρούν με την ρυθμιστική υπομονάδα μετατοπίζοντας μ' αυτό τον τρόπο τη κινάση PI3K στην κυτταρική μεμβράνη. Εκτός από τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, ορισμένες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη PKC, η SHP1, η Rac, η Rho και η Src, μπορούν να ενεργοποιήσουν τις PI3K κινάσες (Hennessy et al. 2005). Αφού ενεργοποιηθούν, οι PI3K κινάσες φωσφορυλιώνουν το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση D3 των λιπιδίων της φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης PI(4)P και PI(3,4)P2 παράγοντας τα λιπίδια PI(3,4)P2, και PI(3,4,5)P3 αντίστοιχα. Τα λιπίδια PI(3,4,5)P3 έχουν την δυνατότητα να συνδέονται με ένα φάσμα μορίων που περιέχουν περιοχή με ομολογία πλεκστρίνης (pleckstrin-homology, **PH**), καθώς και τις περιοχές FYVE, Phox, C1 και C2, και να τα ενεργοποιούν. Κάποια μόρια που περιέχουν την περιοχή με ομολογία πλεκστρίνης είναι η πρωτεΐνη AKT (γνωστή και ως PKB), η οικογένεια των κινασών της τυροσίνης Tec, οι παράγοντες Rac. Η ενεργοποίηση των παραγόντων Rac από τα λιπίδια PI(3,4,5)P3 παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιάταξη της ακτίνης του κυτταροσκελετού, στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ασβεστίου και στην γονιδιακή ρύθμιση (Cantley et.al, 2002). Ενεργοποιώντας την πρωτεΐνη AKT, η PI3K κινάση εμπλέκεται στη ρύθμιση μιας σειράς κυτταρικών λειτουργιών.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί η σχέση της PI3K/Akt με τα μόρια mTOR. Το μονοπάτι PI3K/Akt είναι συχνά ενεργοποιημένο στον καρκίνο και μπορεί να συνεργάζεται στην καρκινογένεση. (Menon et.al, 2008). Επιπλέον, ενεργοποιεί το σύμπλοκο mTORC1 μέσω καταστολής της ανασταλτικής δράσης του πρωτεϊνικού συμπλόκου TSC1/TSC2 (Tuberous sclerosis complex 1-Tuberous sclerosis complex 2) στην πρωτεΐνη Rheb (Ras homolog enriched in brain) (Foster et.al, 2010).

Αντίστοιχα με το σύμπλοκο mTORC1, και το σύμπλοκο mTORC2 μπορεί να ενεργοποιηθεί από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και αμινοξέα και μάλιστα και αυτή η ενεργοποίηση μπορεί να εξαρτάται από τη μεσολάβηση της PI3K (Foster et.al, 2010, Tato et.al, 2011). Αντιθέτως, το σύμπλοκο TSC1/TSC2, το οποίο καταστέλλει την mTORC1, δρα ενεργοποιώντας τον άξονα mTORC2 (mTORC2 signaling) υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Το σύμπλοκο mTORC2 ρυθμίζει εκτός από τη φωσφορυλίωση της Akt και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών SGK1 (serum- and glucocorticoidinduced protein kinase 1) και PKCα, ελέγχει την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης, του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού καθώς και της κυτταρικής επιβίωσης (Foster 2010, Tato 2011). Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες-στόχοι του συμπλόκου mTORC1 είναι οι κινάσες S6 [πιο συγκεκριμένα η S6K1 (γνωστή και ως p70S6) και η S6K2] και οι πρωτεΐνες 4E-BP1 and 4E-BP2 (Eukaryotic initiating factor-4e (eIF4e) binding proteins 1 and 2) (Menon 2008). Μετά την ενεργοποίησή του το σύμπλοκο mTORC1 ευοδώνει καίριες αναβολικές διαδικασίες όπως η βιογένεση ριβοσωμάτων, η cap-εξαρτώμενη πρωτεϊνική μετάφραση, η είσοδος στο κύτταρο γλυκόζης και αμινοξέων, η βιοσύνθεση αμινοξέων, πρωτεϊνών και λιπιδίων καθώς και η αντίληψη μεταβολών στα επίπεδα του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Επιπλέον, ευοδώνεται η μεταγραφή γονιδίων, η προαγωγή του κυτταρικού κύκλου και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός καθώς και η επιβίωση του κυττάρου (Foster et.al, 2010, Menon et.al, 2008, Choo et.al, 2009). Ακόμη, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο mTORC1 καταστέλλει την αυτοφαγία και άλλες καταβολικές διεργασίες όπως η οξείδωση λιπαρών οξέων και η αποδόμηση πρωτεϊνών. Αντιθέτως, ενεργοποιείται η αερόβια γλυκόλυση.

Η διαταραγμένη ενεργοποίηση του κυτταρικού μονοπατιού mTORC1 έχει συσχετισθεί με την καρκινογένεση σε πολλές περιπτώσεις κακοήθων νεοπλασμάτων. Η

ενεργοποίηση αυτή διαταράσσει την ομοιόσταση του κυττάρου και συμβάλει στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, στην ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση, στην επιβίωση καθώς και στην αγγειογένεση και στο μεταστατικό δυναμικό (Menon 2008). Τα ίδια αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν από την ανώμαλη ενεργοποίηση του κυτταρικού μονοπατιού mTORC2 (Tato 2011, Zhang 2010).

Το μονοπάτι PI3K/Akt στην κακοήθεια

Αλλαγές και μεταλλάξεις της PI3K στην κακοήθεια

Σε διάφορα είδη ανθρώπινων κακοήθων εξεργασιών έχουν παρατηρηθεί ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις κινάσες PI3K. Μεταλλάξεις των υπομονάδων της PI3K κινάσης εμπλέκονται στην καρκινογένεση των ωθηκών, του μαστού, του στομάχου καθώς και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Lee et al. 2005). Για παράδειγμα, στο 40% των καρκίνων των ωθηκών, παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *PIK3CA* (Shayesteh et al. 1999). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ενίσχυση και υπερ-έκφραση του *PIK3CA* στον καρκίνο των ωθηκών, του μαστού και του στομάχου. Όσον αφορά τις σωματικές μεταλλάξεις του *PIK3CA* γονιδίου, αυτές έχουν εντοπιστεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου (25% με 32%), στον καρκίνο του στομάχου (25%), στον καρκίνο του μαστού (3% με 8%), στον καρκίνο του πνεύμονα (4%) και στα γλοιοβλαστώματα (27%) (Samuels and Velculescu 2004). Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις έχουν σαν αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση των PI3K κινασών στα κύτταρα.

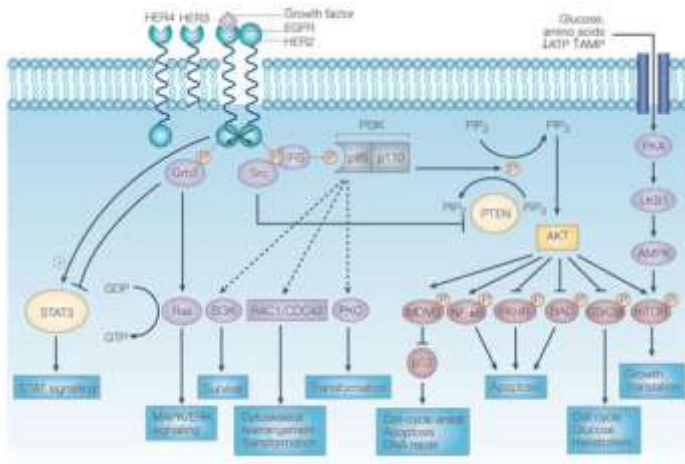
Η αλληλούχηση των γονιδίων *PIK3CA* στα διάφορα είδη των νεοπλασμάτων έχει πραγματοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό και η ταυτοποίηση της πλειοψηφίας αυτών των ειδικών για τους όγκους μεταλλαγών στη κωδική περιοχή του γονιδίου έχει ολοκληρωθεί.

PI3K/Akt και Αγγειογένεση

Αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν την συμμετοχή του μονοπατιού PI3K/AKT στη ρύθμιση της έκφρασης του παράγοντα αγγειογένεσης VEGF και του παράγοντα HIF-1, δια μέσου της ενεργοποίησης του HDM2 και του p70S6K1. Οι παράγοντες VEGF και HIF-1 αποτελούν τους διαμεσολαβητές για τη μετάδοση τωνογονογενετικών σημάτων του συγκεκριμένου μονοπατιού, προωθώντας την ανάπτυξη και την αγγειογένεση των όγκων (Xia et al. 2006). Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, ο VEGF είναι ο κύριος επαγωγέας της αγγειογένεσης, ενώ ο HIF-1 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της έκφρασης του VEGF. Ο HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες, την HIF-1α και την HIF-1β (Xia et al. 2006). Η HIF-1α παράγεται σε συνθήκες υποξίας, καθώς και ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες και στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων, ενώ η HIF-1β παράγεται συστηματικά σε όλα τα κύτταρα. Διάφορες εργασίες έχουν δείξει πως το μονοπάτι PI3K/AKT παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της HIF-1α και του VEGF (Skinner et al. 2004). Η υπερ-έκφραση της ενεργοποιημένης μορφής της PI3K κινάσης επάγει *in vivo* την αγγειογένεση, που χαρακτηρίζεται από την «εκβλάστηση» νέων αιμοφόρων αγγείων την μεγέθυνση των προϋπαρχόντων αγγείων (Skinner et al. 2004). Αξίζει να σημειωθεί πως και το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK εμπλέκεται στη ρύθμιση της αγγειογένεσης διαμέσου της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

Το μονοπάτι PI3K/Akt στον καρκίνο της κύστης

Τα μοριακά στοιχεία του μονοπατιού PI3K/Akt περιγράφηκαν με λεπτομέρεια πιο πάνω. Εδώ θα αναφέρουμε στοιχεία που έχουν να κάνουν ειδικότερα με το μονοπάτι αυτός τον καρκίνο της κύστης. Μια εικόνα που αναφέρεται στο μονοπάτι αυτό βλέπουμε στην εικόνα 18 (Hennessy et.al 2005).



Εικ.18 Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού PI3K/Akt

Η πρώτη πολύ σημαντική παρατήρηση έχει να κάνει με την λειτουργία του PTEN και πως επηρεάζει το μονοπάτι PI3K/Akt στον καρκίνο της κύστης. Όπως και σε άλλους τύπους καρκίνου η PTEN δρα ανασταλτικά στο μονοπάτι του PI3K/Akt (Aveyard et.al, 1999) και η απώλεια λειτουργίας του έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ιδιαίτερα επιθετικών μορφών της νόσου (Saal et.al, 2007). Έχει αποδειχθεί ότι σε διάφορες μορφές της νόσου, κυρίως στον διηθητικό καρκίνο (περίπου στο 30% των περιπτώσεων), το μόριο της PTEN εμφανίζει σημαντικές μεταλλάξεις στην αλληλουχία του DNA του (Knowles et.al, 2009, Platt et.al, 2009). Σε μη διηθητικό καρκίνο το ποσοστό αυτό είναι χαμηλότερο, περί του 6.6% (Aveyard et.al, 1999).

Το PTEN έχει επίσης υποδειχθεί ως ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάζει την ανταπόκριση του ασθενούς στην θεραπεία. Βέβαια εδώ υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες αφού έχουμε το παράδειγμα μελέτης που υποδεικνύει ότι η απώλεια του PTEN είναι δυνατό να επιφέρει ευαισθησία σε παράγοντες- φάρμακα ενάντια στο μονοπάτι του PI3K/Akt, όπως είναι το LY294002 (Kanda et.al, 2009), ενώ σε άλλη μελέτη η έλλειψη έκφρασης του PTEN έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη ευαισθησίας σε φάρμακο ενάντια στο mTOR, rapamycin (Seront et.al, 2013).

Το PTEN επίσης έχει υποδειχθεί να συνδέεται και με το μονοπάτι του p53 το οποίο επίσης εμφανίζει συχνές μεταλλάξεις στον καρκίνο της κύστης. Έχει συγκεκριμένα υποδειχθεί ότι η ταυτόχρονη έλλειψη έκφρασης του PTEN αλλά και του p53, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του καρκίνου της κύστης (Puzio-Cuter et.al, 2009). Σε ποντίκια που έγινε η μελέτη και τα οποία εμφάνιζαν δυσλειτουργία ως προς και τα δύο γονίδια μαζί, εμφανίστηκε επιθετικός καρκίνος της κύστης. Η ταυτόχρονη έλλειψη των γονιδίων αυτών έδειξε όμως και μεγαλύτερη ευαισθησία σε θεραπεία με rapamycin.

Επίσης μεταλλάξεις στο μονοπάτι PI3K/Akt, είναι δυνατό να επηρεάσουν την λειτουργία του μονοπατιού αυτού και ειδικότερα στην πρωτεΐνη PI3K. Από τις συνηθέστερες μεταλλάξεις στο μόριο αυτό εμφανίζονται στην πρωτεΐνη PI3KC η οποία κωδικοποιεί το τμήμα p110α της PI3K. Κατά κανόνα οι μεταλλάξεις σε αυτό το τμήμα της PI3K έχουν να κάνουν με αύξηση της λειτουργίας της PI3K όπως έχει υποδειχθεί και σε άλλους τύπους καρκίνου (Zhao and Vogt, 2007). Στον καρκίνο της κύστης οι μεταλλάξεις στην PI3K εμφανίζονται περισσότερο σε μη διηθητικές κακοήθειες και είναι συνδεδεμένες με την έκφραση της πρωτεΐνης FGF3 και των

μεταλλάξεων σε αυτό το μόριο (Lopez-Knowles et.al, 2004). Οι μεταλλάξεις στην PI3K είναι δυνατό να αποτελέσουν προγνωστικούς παράγοντες για την έκβαση της νόσου αλλά και για την αποσαφήνιση της βιολογίας της πρωτεΐνης αυτής στον καρκίνο της κύστης (Lopez-Knowles et.al, 2004). Μεταλλάξεις οι οποίες έχουν αναιχνευθεί και παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο της κύστης είναι οι E542K και E545K ενώ υπάρχουν και άλλες επτά με λιγότερο σημαντικό ρόλο στην κύστη (Knowles et.al, 2009, Plattet.al, 2009). Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις εντοπίζονται στην καταλυτική υπομονάδα του μορίου της PI3K.

Άλλες μεταλλάξεις του μορίου εμφανίζονται τόσο μεταξύ των δύο υπομονάδων του μορίου και συγκεκριμένα μεταξύ των p110 και p85, κάτι το οποίο επηρεάζει άμεσα την ομαλή λειτουργία της πρωτεΐνης. Μεταλλάξεις στην p85 θα είχαν ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης PI3K (Huang et.al, 2008). Η ακριβής όμως αλλαγή στην λειτουργία της PI3K που μπορεί να πραγματοποιηθεί πρέπει να μελετηθεί περισσότερο στον καρκίνο της ωοθήκης καθώς σε άλλους τύπους καρκίνου τέτοιου είδους μεταλλάξεις επιφέρουν αύξηση της συνεπαγόμενης φωσφορυλίωσης της Akt λόγω αυξημένης λειτουργίας της PI3K (Philp et.al, 2001, Jiang and Liu, 2008).

Στην περίπτωση της Akt, είναι και εδώ πιθανό να παίζουν ρόλο στην καρκινογένεση στην κύστη και ειδικότερα η φωσφορυλιωμένη μορφή της (Oka et. al, 2006) καθώς είναι πιθανό να ενεργοποιούν και το mTOR σύμπλοκο. Μια τέτοια μελέτη δημοσιεύτηκε πρόσφατα και συζητά την ύπαρξη τέτοιων μεταλλάξεων στον καρκίνο της κύστης (Askham et.al, 2010). Χαρακτηριστικές περιπτώσεις τέτοιων μεταλλάξεων είναι η G49A που συναντάται περιπου στο 2,7% των όγκων στην κύστη και παίζει ρόλο στην μετατόπιση της Akt στην κυτταρική μεμβράνη και αύξηση της λειτουργίας της και η G145A η οποία παίζει επίσης ρόλο στην ενεργοποίησή της Akt. Τα ποσοστά εμφανισής τους όμως στον όγκο στην κύστη παραμένουν χαμηλά και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την εξαγωγή λεπτομερέστερων αποτελεσμάτων για την λειτουργία τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση κυττάρων από ιστό

Ο ιστός αποκόπτεται κατά την χειρουργική επέμβαση και στην συνέχεια τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια (της τάξης 1-2 εκατοστών). Ανάλογα με την περαιτέρω χρήση του τοποθετείται είτε σε δοχείο και καταψύχεται στους -80°C , είτε τοποθετείται σε διάλυμα θρεπτικού υλικού RPMI-1640 (Gibco, USA) και χρησιμοποιείται άμεσα.

Στην περίπτωση που θα χρησιμοποιηθεί, τοποθετείται το κομμάτι ιστού σε διάλυμα που περιέχει τα εξής συστατικά:

- 5 mM HEPES buffer 1M
- 50 IU/ml πενικιλίνη / 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ στρεπτομυκίνη
- 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone
- 0,05 mg/ml γκενταμυκίνη
- 0,1% κολλαγενάση Type I
- 30 units/ml DNase Type IV
- 0,01% hyaluronidase Type V

Αφού ο ιστός αναμιχθεί με το διάλυμα αυτό για περίπου 2 ώρες και στην συνέχεια το ομογενοποιημένο διάλυμα διηθείται με μεταλλικό φίλτρο. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στους 1600 rpm για 15 λεπτά και διατηρούμε τα κύτταρα ενώ απομακρύνεται το υπερκείμενο. Τα κύτταρα στην συνέχεια πλένονται με ισοτονικό διάλυμα HBSS (Gibco, USA), τρεις φορές από 10 λεπτά η κάθε μία στους 1600 rpm. Τα κύτταρα αμέσως μετά επικάθονται σε διάλυμα Ficoll Histopaque και φυγοκεντρούνται στους 400g για 30 λεπτά ώστε να διαχωριστούν τα καρκινικά κύτταρα και τα λευκά αιμοσφαίρια από τα απύρρηνα ερυθρά.

2. Απομόνωση Γονιδιωματικού DNA

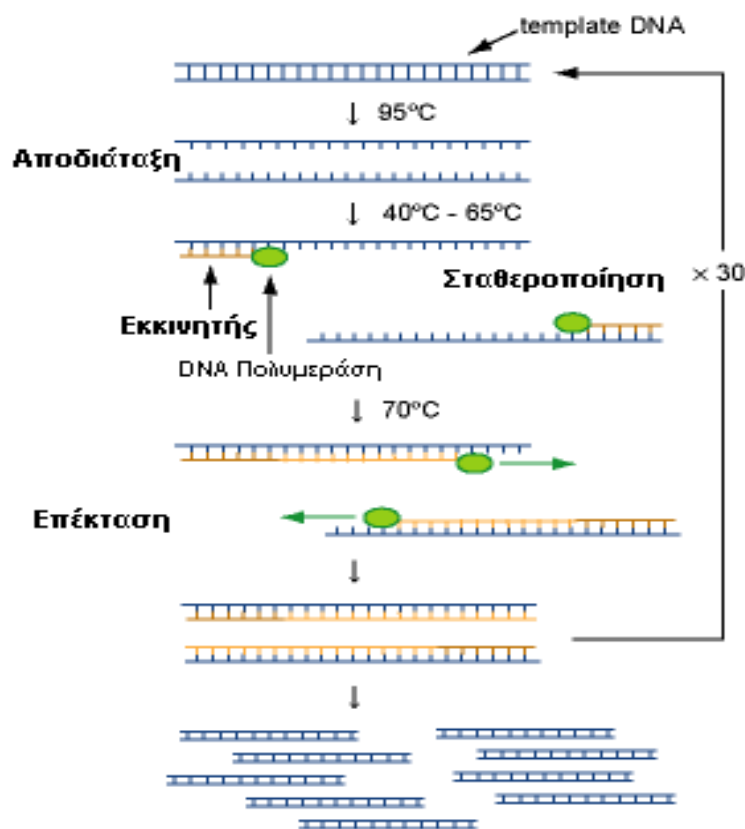
Η απομόνωση του DNA έγινε από τα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν. Έγινε προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ddH₂O, έτσι ώστε ο όγκος του κάθε δείγματος να ανέλθει στα 15 ml. Πραγματοποιείται μετά προσεκτική ανακίνηση και επώαση για 5-15 min. Τα δείγματα στην συνέχεια υπόκεινται σε φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 20 min στους 4°C , με ακολουθία απόχυσης του υπερκείμενου και συγκέντρωση του ιζήματος που περιέχει τα λευκοκύτταρα. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 5 ml 1 % Nonidet P-40, με ανάδευση για 5 min και φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 20 min στους 4°C . Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε 1,7 ml 1xSE λυτικού διαλύματος (π.χ. υποτονικό διάλυμα KCl ή NaCl) και καλή ανάδευση. Ακολουθεί η προσθήκη 10 μl πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml) και 200 μl 10% SDS και επώαση σε ανακινούμενο υδατόλουτρο στους 55°C για όλη την νύχτα (o/n).

Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται προσθήκη 0,66 ml προθερμασμένου διαλύματος 6M NaCl και προσεκτική ανάδευση η οποία ακολουθείται από προσθήκη 1 όγκου χλωροφορμίου και ανάδευση για 30-60 min σε κυκλικό αναδευτήρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 2500 rpm για 10 min για να γίνει διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Έπειτα πραγματοποιείται λήψη και προσεκτική μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε ένα καινούριο σωλήνα (προσέχουμε να μην πάρουμε καθόλου από την μεσόφαση). Ακολουθεί προσθήκη 1 όγκου ισοπροπανόλης, προσεκτική απαλή ανάδευση για την κατακρήμνιση του DNA και συλλογή του DNA με την χρήση μίας λυγισμένης πιπέτας Pasteur και μεταφορά του σε eppendorf. Ακολουθεί ξέπλυμα του DNA με 100 % αιθανόλης και στη συνέχεια με 70 % αιθανόλης και επαναιώρηση του ιζήματος του DNA σε 100-300 μl TE-4. Τοποθετείται στην συνέχεια στους 4°C για

24h για να διαλυθεί. Ακολουθεί μέτρηση της ODs και αποθήκευση στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αρχή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) δεν αποτελεί σύγχρονη ανακάλυψη της επιστήμης, καθώς έχει περιγραφεί ήδη από τη δεκαετία του '70 (Kleppe et al., 1971; Panet and Khorana, 1974). Ωστόσο, η ανακάλυψη των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών στα μέσα της δεκαετίας του 1970 (Chien et al., 1976) και η αυτοματοποίηση της μεθόδου από τον Kary Mullis (Βραβείο Nobel 1994) και τους συνεργάτες του στην εταιρεία Cetus (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987) οδήγησαν στην εδραίωση της χρήσης της από τα τέλη της δεκαετίας του '80 σε πληθώρα εφαρμογών στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας. Η εικόνα 19 αποδίδει σχηματικά την PCR.



Εικόνα 19 : Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων που περιλαμβάνει ο κάθε κύκλος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης(PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA, με τη χρήση δυο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές), συμπληρωματικών για κάθε μια από τις δυο αλυσίδες του υπό μελέτη τμήματος DNA. Με τη βοήθεια των εκκινητών, ενός θερμοανθεκτικού ενζύμου (Taq Polymerase), επιμέρους συστατικών (βλ. πιο κάτω) και τη διαδοχική εναλλαγή θερμοκρασιακών συνθηκών, πραγματοποιείται ταυτόχρονη επέκταση και των δυο συμπληρωματικών αλυσίδων.

Η διαδικασία περιλαμβάνει πολλαπλούς επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διάφορα θερμοκρασιακά επίπεδα, προϋποθέτοντας ταχεία μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια: α)

αποδιάταξη (**denaturation**) του DNA-στόχου, β) σταθεροποίηση των εκκινητών (**annealing**) και γ) επέκταση των εκκινητών (**extension**). Κάθε νέο-σχηματιζόμενο μόριο χρησιμοποιείται στον επόμενο κύκλο ως μήτρα με αποτέλεσμα ο αριθμός των αντιγράφων του εν λόγω τμήματος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά και βάση του μαθηματικού τύπου 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό είναι αρκετοί 30-40 κύκλοι αντίδρασης για την σύνθεση 100ng-1μgDNA.

Τα συστατικά και οι παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) είναι οι ακόλουθοι:

Στόχος-DNA (template): Τα κύρια χαρακτηριστικά του DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι: i) να μην είναι κατακερματισμένο (degraded) στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί άθικτη η συγκεκριμένη περιοχή και ii) να είναι υψηλής καθαρότητας, χωρίς την πρόσμιξη φαινολών, πολυσακχαριτών, απορρυπαντικών, EDTA ή άλλων χημικών που μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση. Η ποσότητα του DNA για μια αντίδραση, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 και 500 ng. Ειδικότερα, όταν ο στόχος-DNA βρίσκεται σε πολλά αντίγραφα μέσα στο γονιδίωμα η ποσότητα του DNA που χρειάζεται για την αντίδραση κυμαίνεται από 10-100 ng, ενώ όταν ο στόχος-DNA είναι μοναδικός ή σε λίγα αντίγραφα τότε η ποσότητα κυμαίνεται από 100-500 ng. Όταν η ποσότητα του DNA υπερβαίνει μια κρίσιμη τιμή (> 1000 ng), υπάρχει πιθανότητα δημιουργίας παράπλευρων, μη επιθυμητών προϊόντων που δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο (non-specific amplification).

Εκκινητές (primers): Οι εκκινητές αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της αντίδρασης, γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και χρησιμεύουν ως οδηγοί, προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτιδικά της αλληλουχίας-στόχου. Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια το μήκος των οποίων κυμαίνεται ανάλογα με τη χρήση τους (18-30 βάσεις). Η επιθυμητή συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση κυμαίνεται μεταξύ των 10 και 50 pmol. Σε υψηλές συγκεντρώσεις εκκινητών αυξάνεται η πιθανότητα να δημιουργηθούν μη ομόλογοι (τυχαίοι) υβριδισμοί μεταξύ εκκινητή και DNA, αλλά και των εκκινητών μεταξύ τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία DNA τμημάτων που δεν αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα.

Για την κατασκευή των δύο εκκινητών μιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη τα παρακάτω:

i) Οι αλληλουχίες τους δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ειδικά στο 3' άκρο.

ii) Το σημείο τήξης κάθε εκκινητή υπολογίζεται γενικά από τον τύπο: $Tm = 2*(A+T) + 4*(G+C)$ όπου (A+T) και (G+C) ο αριθμός των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων του εκκινητή.

iii) Οι αλληλουχίες τους πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G και C νουκλεοτίδια, ώστε τα σημεία τήξης Tm να μην διαφέρουν σημαντικά (λόγω της πυκνότητας των υδρογονικών δεσμών).

iv) Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να περιλαμβάνει περιοχές συμπληρωματικές, γιατί κατά τη διάρκεια της αναδιάταξης δημιουργούνται «φουρκέτες» (loops).

v) Κατά το σχεδιασμό τους θα πρέπει η κατανομή των νουκλεοτιδίων να είναι τυχαία και να αποφεύγονται επαναλήψεις νουκλεοτιδίων καθώς και περιοχές με πολυπουρίνες ή πολυπυριμιδίνες.

Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs): Τα τέσσερα συνθετικά τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, dATP, dTTP, dCTP και dGTP είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Είναι σημαντικό τα δεοξυνουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους ώστε να μην γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η συγκέντρωση των δεοξυνουκλεοτιδίων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 200 μM .

Συγκέντρωση ιόντων Μαγνησίου (Mg^{+2}): Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, που συνήθως προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου (MgCl_2), είναι εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας, που διασφαλίζει την ακεραιότητα της διαδικασίας, καθώς επηρεάζει τον υβριδισμό του εκκινητή, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και των προϊόντων της PCR, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων και την δρατικότητα της πολυμεράσης. Οι επιθυμητές και αποδοτικές συγκεντρώσεις MgCl_2 κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 2,5 mM. Υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε μη-ειδικά προϊόντα, ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις μειώνουν την απόδοση της PCR καθώς τα ιόντα Mg^{+2} δρουν ως συνένζυμα της πολυμεράσης και επηρεάζουν τη λειτουργία της. Τέλος, η παρουσία EDTA ή άλλων χημικών παραγόντων που δεσμεύουν τα ιόντα μαγνησίου στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA, μπορεί να διαταράξει τη συγκέντρωση του και κατ'επέκταση την αποδοτικότητα της διαδικασίας.

Ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης (buffer): Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται συνήθως σε τελική συγκέντρωση 1X και έχει ως στόχο να δημιουργήσει ένα ιοντικό περιβάλλον, κατάλληλο να διευκολύνει τόσο τη σταθεροποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία, όσο και τη δράση της πολυμεράσης.

DNA Πολυμεράση (polymerase): Η πολυμεράση είναι το ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA στόχου μετά την αποδιάταξη και τον υβριδισμό των εκκινητών. Συγκεκριμένα, το ένζυμο που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι η θερμοανθεκτική *Taq*DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από βακτήρια (*Thermophilus aquaticus*) που ζουν σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία και είναι πολυμεράση τύπου I με 5'→ 3' εξωνουκλεοτιδική δράση. Το θερμοκρασιακό άριστο της δράση του ενζύμου είναι οι 72°C και ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 50 κύκλοι στους 95°C. Η συγκέντρωση του ενζύμου στην αντίδραση εξαρτάται τόσο από τον όγκο της αντίδρασης όσο και από την ίδια την εφαρμογή.

Ένα τυπικό παράδειγμα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης καθώς και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που ακολουθείται παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα.

Υλικά	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA στόχος	10-500 ng	a μl

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)	10 X	5 μ l
Διάλυμα MgCl ₂	25 mM	3 μ l
Εκκινητής forward	10 pmol	2 μ l
Εκκινητής reverse	10 pmol	2 μ l
dNTPs	2,5 mM το καθένα	4 μ l
Taq DNA Πολυμεράση	5U/ μ l	0,3 μ l
Υπερκαθαρό νερό	---	50-(a+16,3) μ l
Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	94°C για 3 min	
Αποδιάταξη DNA στόχου (denaturation)	94°C για 30 sec	Αριθμός κύκλων αντίδρασης : 35-40
Σταθεροποίηση εκκινητών (annealing)	(Ta°C)* για 30 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	72°C για b** min	
Τελική επέκταση	72°C για 10 min	

Πίνακας 3. Επεξήγηση της PCR.

* **Ta** είναι η θερμοκρασία σταθεροποίησης των εκκινητών και εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (Tm) αυτών. Συνήθως $Ta = Tm - 4^{\circ}C$.

** **b** είναι ο χρόνος που απαιτείται για την επέκταση των εκκινητών και εξαρτάται από το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος. Γενικότερα ισχύει η εξής παραδοχή: 1min/1Kb.

4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται σε πήκτωμα αγαρόζης, κάτω από την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση του πεδίου (volts/cm πηκτώματος) ρυθμίζονται με βάση τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν (Sambrook *et al.*, 1989).

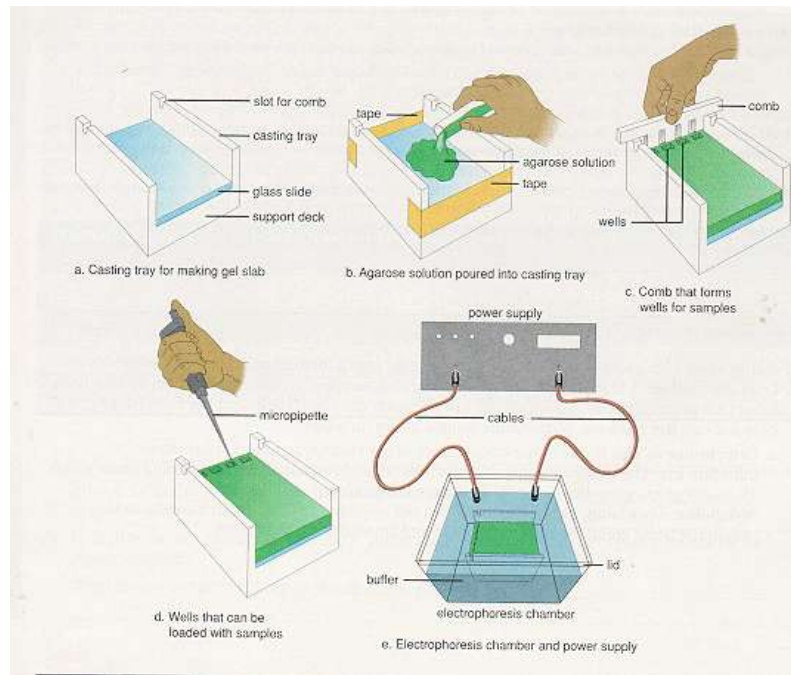
Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις (4) παραμέτρους οι οποίες είναι: **i**) το μέγεθος του DNA· γραμμικά δίκλινα μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του δεκαδικού λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους, **ii**) η συγκέντρωση της αγαρόζης· η χρήση πηκτωμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις επιτρέπει το διαχωρισμό ενός

μεγάλου εύρους μεγεθών DNA, **iii**) η στερεοδιάταξη του DNA: η υπερελικωμένη κυκλική μορφή (supercoiled), η ανοιχτή κυκλική μορφή και το γραμμικό μόριο DNA ιδίου Μ.Β. έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης, και **iv**) η ένταση του ρεύματος: η κινητικότητα γραμμικών τμημάτων DNA είναι ευθέως ανάλογη της τάσης του ηλεκτρικού ρεύματος, για μικρές τιμές τάσης. Όσο αυξάνεται η τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζουμε, η κινητικότητα τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε τμήμα. Για το λόγο αυτό, μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης καθώς αυξάνεται η εφαρμοζόμενη τάση.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

- ✱ Σε κωνική φιάλη προστίθενται 0,75 g (1,5%) αγαρόζης σε 50 ml διαλύματος 1X TBE (0,04 M Tris-acetate, βορικό οξύ και 0,001 M EDTA, pH 8) Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιείται με βρασμό για 1,5 min περίπου σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 900 Watt.
- ✱ Στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (45 μl/l αρχικής συγκέντρωσης 10mg/ml) κάτω από συνεχή ανάδευση.
- ✱ Το διάλυμα αφήνεται για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία της αγαρόζης να φτάσει τους 60°C.
- ✱ Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης με προσοχή για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων, ώστε να σχηματισθεί ενιαίο, συμπαγές πήκτωμα.
- ✱ Εφαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης.
- ✱ Το πήκτωμα στερεοποιείται και μετά τη βύθισή του σε διάλυμα 1X TBE, αφαιρείται η «χτένα».
- ✱ Σε κάθε οπή τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα δείγματος που έχει αναμιχθεί με διάλυμα χρωστικής για την καταβύθισή του. Στην πρώτη οπή φόρτωσης τοποθετείται κατάλληλος δείκτης μοριακού βάρους.
- ✱ Τα ηλεκτρόδια συνδέονται στους υποδοχείς της συσκευής και ρυθμίζεται η κατάλληλη τάση ηλεκτρικού πεδίου.
- ✱ Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ώστε να μπορούν να διακριθούν και να φωτογραφηθούν, με κατάλληλο σύστημα φωτογράφισης, οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν.

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια της ηλεκτροφορητικής μεθόδου. Η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται με βάση τη φωτεινότητα της ζώνης που διαχωρίστηκε και τη σύγκρισή της με κατάλληλο μοριακό δείκτη (marker). Όσο πιο έντονη είναι η ζώνη, τόσο περισσότερη είναι η ποσότητα του DNA που περιέχεται στο συγκεκριμένο δείγμα. Ο ποιοτικός έλεγχος συνίσταται στην απουσία προσμίξεων, φαινόλης ή RNA, καθώς και στην ακεραιότητα του DNA που απομονώθηκε. Η απουσία «αλείμματος» (smear) από το πήκτωμα της αγαρόζης, υποδηλώνει ότι το απομονωμένο DNA είναι ικανοποιητικής ποιότητας.



Εικόνα 19 : Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ηλεκτοφόρησης σε gel αγαρόζης.

5.Ετοιμασία του υποστρώματος DNA

Μετά την ενίσχυση της PCR, το τελικό προϊόν στο διάλυμα βρίσκεται μαζί με τους εκκινητές, dNTPs, ένζυμο και συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για να ετοιμαστεί το προϊόν της PCR για αλληλούχιση εξαρτάται από τις ποσότητες αυτών των συστατικών και την χημεία που χρησιμοποιείται για την αντίδραση της αλληλούχισης. Περίσσεια εκκινητών εξακολουθούν να δραστηριοποιούνται από την αντίδραση της PCR και ανταγωνίζονται με τους εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για την αλληλούχιση σε θέσεις πρόσδεσης και αντιδραστήρια. Εάν περισσότεροι από έναν εκκινητή είναι παρόντες, οι φθορίζουσες σημάνσεις ενσωματώνονται στα επιμηκυσμένα προϊόντα μετά την πρόσδεση των εκκινητών στο υπόστρωμα. Αυτό έχει την συνέπεια να παράγονται πολλαπλές κλιμακωτές αλληλουχίες έχοντας ως αποτέλεσμα τον θόρυβο και την μη ανάγνωση της μελετώμενης αλληλουχίας.

Περίσσεια dNTPs από την αντίδραση της PCR μπορούν να επηρεάσουν την ισορροπία της αντίδρασης αλληλούχισης, έχοντας ως αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό στα μικρότερα κομμάτια που έχουν επεκταθεί.

Στα μη ειδικά PCR προϊόντα συμπεριλαμβάνονται διμερή των εκκινητών και δευτερογενή προϊόντα. Συμπεριφέρονται ως υποστρώματα στην αντίδραση της αλληλούχισης και παράγουν προϊόντα επιμήκυνσης τα οποία καταλήγουν να προκαλούν θόρυβο. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να εμφανιστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη πριν την αντίδραση αλληλούχισης.. Εάν είναι παρόν θα πρέπει η PCR να βελτιστοποιηθεί και να επαναληφθεί πριν την αντίδραση αλληλούχισης. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν φωλεακοί εκκινητές (nestedprimers) για την αντίδραση της αλληλούχισης, οι οποίοι προσδένονται πιο εσωτερικά σε σχέση με το πρώτο ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

Η μέθοδος καθαρισμού που χρησιμοποιείται για το DNA μπορεί να έχει επίδραση στην ποιότητα του υποστρώματος.

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (Cat. No 28106, 250 αντιδράσεις), για να ετοιμαστούν μονόκλινα υποστρώματα.

6. Πρωτόκολλο καθαρισμού PCR προϊόντων(100bp-10kb) της QIAquick kit με την χρήση μικροφυγόκεντρο.

Αρχικά πραγματοποιείται προσθήκη 5 όγκων από το ρυθμιστικό διάλυμα PB σε κάθε δείγμα από την PCR και ανάδευση. Εφαρμογή του κάθε δείγματος, άμεσα, όπως έχει προκύψει παραπάνω σε στήλη φυγοκέντρωσης της QIAquick και φυγοκέντρωση για 30-60 sec. Ότι περάσει μέσα από την στήλη απομακρύνεται και η στήλη τοποθετείται πίσω στο ίδιο σωληνάκι. Προσθέτνται 0,75 ml ρυθμιστικού PE σε κάθε κολόνα και φυγοκέντρωση για 30-60 sec. Απομακρύνεται ότι περάσει μέσα από την στήλη και τοποθέτηση της κάθε κολόνας πίσω στο ίδιο σωληνάκι. Φυγοκέντρωση για 1 min για στέγνωμα και ακόλουθη τοποθέτηση της κάθε κολόνας σε καθαρό και αποστειρωμένο 1,5 ml σωληνάκι. Για το εκχύλισμα του DNA, πραγματοποιείται προσθήκη 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB στο κέντρο της μεμβράνης της κάθε κολόνας. Πραγματοποιείται παραμονή της κολόνας για ένα 1min προκειμένου να ενυδατωθεί και στο τέλος πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για ένα 1 min για την εκχύλιση.

Όλα τα βήματα που χρειάστηκαν φυγοκέντρωση έγιναν στους 13,000 rpm (~17,900 xg) σε μία συμβατική επιτραπέζια φυγόκεντρο.

Η καθαρότητα των ενισχυμένων προϊόντων της PCR μπορεί να επιτευχθεί δοκιμάζοντας διαφορετικά μεγέθη σε ένα ή και περισσότερους από τους παρακάτω τρόπους :

- Η ποσότητα του υποστρώματος DNA
- Προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών
- Η συγκέντρωση των εκκινητών
- Η συγκέντρωση του ενζύμου
- Η συγκέντρωση των ιόντων Mg⁺²
- Η συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων
- Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος
- Ο αριθμός των κύκλων
- PH

Κακή ποιότητα του υποστρώματος είναι συνήθως η κοινή αιτία των προβλημάτων αλληλούχισης, προκαλώντας αδύνατο σήμα, δεδομένα μη αναγνωρίσιμα ή με θόρυβο όπως κορυφή κάτω από άλλη κορυφή.

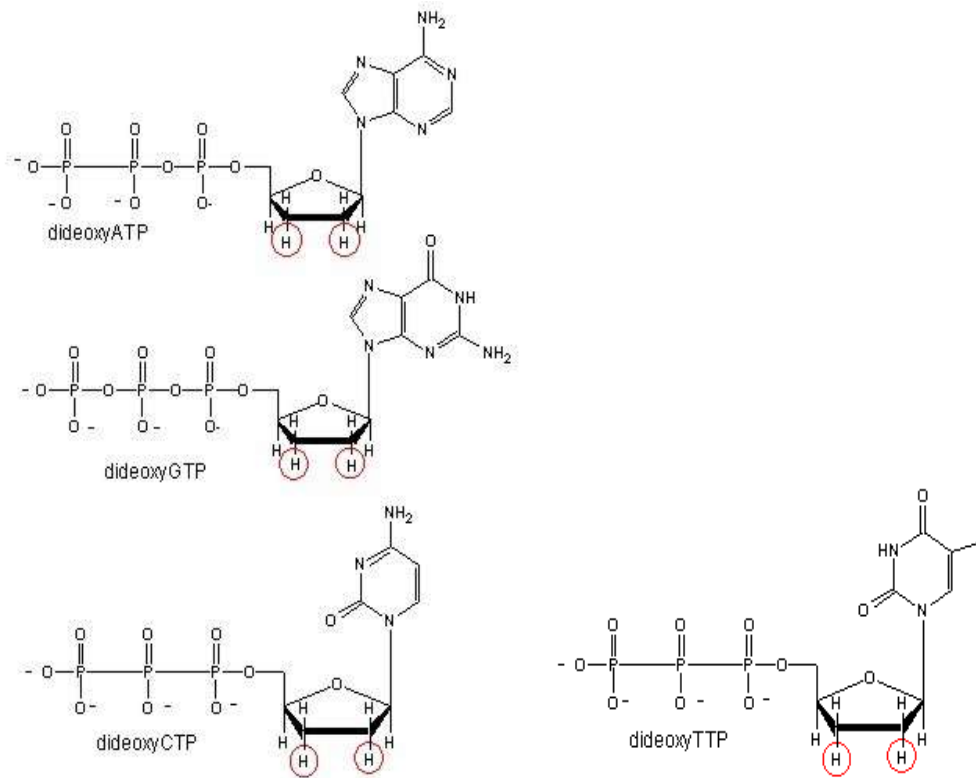
7. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA (DNA Sequencing)

Είναι ο προσδιορισμός της ακριβούς ανάγνωσης των βάσεων σε ένα απομονωμένο τμήμα DNA. Η πιο δημοφιλής μέθοδος για να πραγματοποιηθεί είναι η μέθοδος του Sanger (Frederick Sanger του απονεμήθηκε βραβείο Nobel Χημείας το 1980 για αυτή την ανακάλυψή του).

Στηρίζεται στη χρήση ειδικών αναστολέων του πολυμερισμού του DNA (*in vitro*), τα οποία ονομάζονται 2'-3' δι-δεοξυ-νουκλεοτίδια (ddNTPs) (Εικόνα 27). Τα ddNTPs είναι παρόμοια με τα δεοξυ-νουκλεοτίδια dNTPs, έχουν όμως μία σημαντική διαφορά. Αν και μπορούν να ενσωματωθούν στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα, τους λείπει ένα OH στο 3 άτομο άνθρακα, το οποίο εμποδίζει την δημιουργία φωσφοδιεστερικού

δεσμού μεταξύ της 3' OH ομάδας στο επιμηκνόμενο άκρο του εκκινητή και της 5' φωσφορικής ομάδας στο νεοεισερχόμενο νουκλεοτίδιο (dNTP), προκαλώντας τον πρώιμο τερματισμό της σύνθεσης του DNA. Η αύξηση γίνεται με κατεύθυνση 5'→3'.

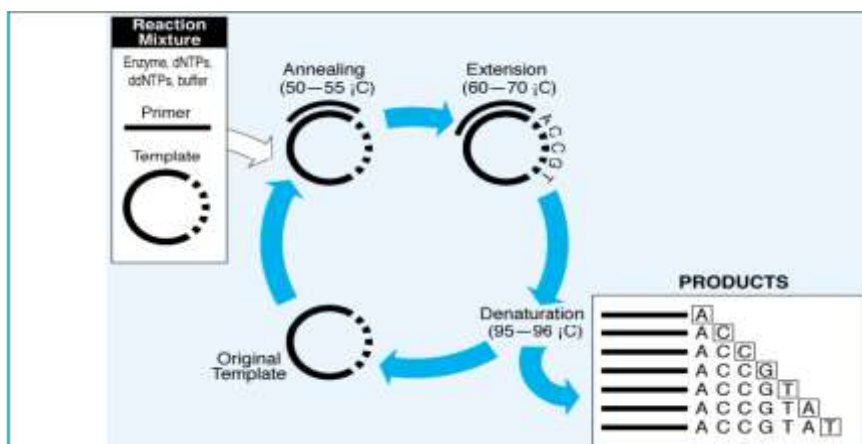
Τα ddNTPs που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις αλληλούχισης της εργασίας είναι μέρος μίας τυποποιημένης συσκευασίας (Big Dye Terminator v 3.1). Φέρουν διαφορετικές φθορίζουσες σημάσεις για κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs. Κάθε χρωστική σήμανση εκπέμπει φως σε διαφορετικό μήκος κύματος όταν διεγερθεί από ένα laser ιόντων Αργού.



Εικόνα 21 : Δι-δεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs)

7. Αντίδραση κυκλικής αλληλούχισης (Cycle Sequencing Reaction)

Είναι μία απλή μέθοδος στην οποία γίνονται αλληπαλλήλοι κύκλοι αποδιάταξης, πρόσδεσης και επιμήκυνσης σε ένα θερμικό κυκλοποιητή και έχει ως αποτέλεσμα την γραμμική ενίσχυση των επιμηκυσμένων προϊόντων (**Εικόνα 22**).



Εικόνα 22: Η αντίδραση κυκλικής αλληλούχισης με την μέθοδο των σημασμένων χρωστικών τερματισμού (Dyeterminatorlabelling). (Ανατύπωση από ChemistryGuide, AutomatedDNAsequencing, 1998)

Για την αντίδραση κυκλικής αλληλούχισης χρησιμοποιείται :

I. Καθαρισμένο υπόστρωμα DNA. Η ποσότητα του DNA μπορεί να επιδράσει στην ποιότητα των δεδομένων που θα ληφθούν από το ηλεκτροφοριογράφημα. Πολύ υπόστρωμα μικραίνει την δυναμικότητα της ανάλυσης, πολύ λίγο μειώνει την δύναμη του σήματος και το ύψος κάθε κορυφής. Για προϊόντα PCR μέχρι 2000 bp συνιστάται 40 έως 100 ngDNA για κάθε αντίδραση αλληλούχισης.

II. Τυποποιημένη Συσκευασία (Kit) (BigDyeTerminatorv 3.1 cyclesequencingreadyreaction) έτοιμο για αντίδραση το οποίο περιέχει μίγμα :

□ **DNA πολυμεράση I.** Χρησιμοποιείται η *Ampli TaqFsDNA* πολυμεράση η οποία είναι ένας μεταλλαγμένος τύπος της *Taq (ThermusAquaticus)*. Περιέχει μία σημειακή μεταλλαγή στην ενεργή της θέση (κατάλοιπο 667), αντικαθιστώντας την φαινυλανίνη με τυροσίνη παρέχοντας έτσι μειωμένη ευαισθησία έναντι των διδεοξυνουκλεοτιδίων επάγοντας ένα μοτίβο με πολύ περισσότερη ομοιόμορφες κορυφές. Επίσης περιέχει και μία σημειακή μεταλλαγή στο αμινοτελικό άκρο της αντικαθιστώντας την γλυκίνη με ασπαρτικό οξύ στο κατάλοιπο 46, το οποίο σχεδόν καταργεί όλη την 5'→ 3' νουκλεολυτική ενεργότητα. Εάν τα διδεοξυνουκλεοτίδια συχνά αφαιρόντουσαν και αντικαθίστανται σε μία συγκεκριμένη θέση από δεοξυνουκλεοτίδια, τελικά θα υπήρχε μικρός ή και καθόλου τερματισμός σε αυτή την θέση.

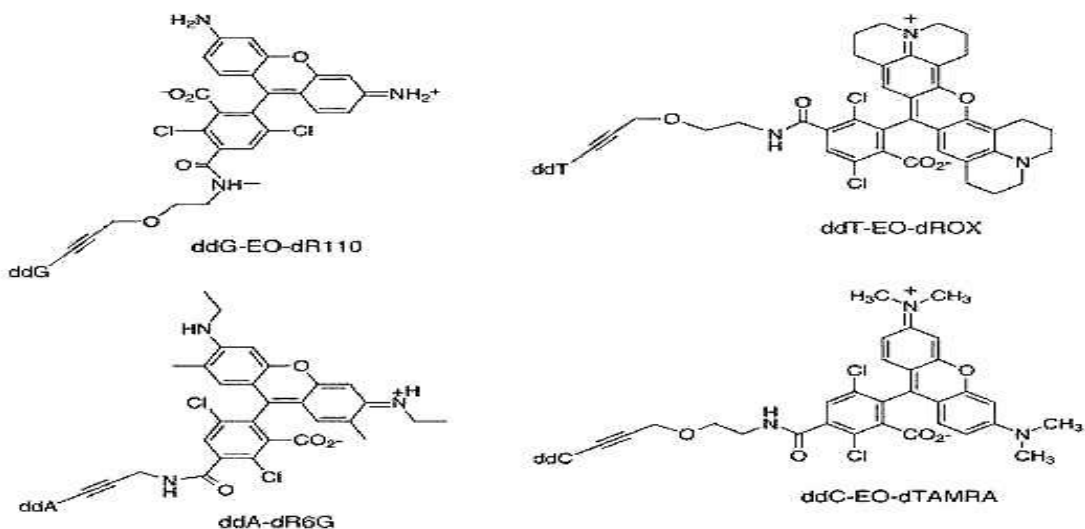
□ **Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια** (dATP,dGTP, dCTP, dTTP)

□ **Τριφωσφορικά δι-δεοξυνουκλεοσίδια** (ddATP,ddGTP, ddCTP, ddTTP)

Ένα μίγμα και των τεσσάρων δι-δεοξυ-νουκλεοτιδίων το κάθε ένα σε περιορισμένη ποσότητα και σημασμένο να φθορίζει σε διαφορετικό μήκος κύματος όταν διεγερθεί.

Χρησιμοποιούνται χρωστικές Big Dye Terminator v 3.1, των οποίων η δομή τους περιέχει μία επιπρόσθετη φθορίζουσα χρωστική *6-carboxyfluorescein*, η οποία έχει βελτιστοποιηθεί να απορροφά την ενέργεια διέγερσης από τα ιόντα αργού του laser, συνδεδεμένη με κάθε μία από τις τέσσερις παλαιότερες *dichlororhodamine* χρωστικές, οι οποίες εκπέμπουν το φάσμα (**Εικόνα 23**).

Terminator	Dye Label
A	dichloro[R6G]
C	dichloro[TAMRA]
G	dichloro[R110]
T	dichloro[ROX]



Εικόνα 23 : dRhodamine Terminators. (Ανατύπωση από Chemistry Guide, Automated DNA sequencing, 1998)

□ **rTthpyrophosphatase**, διασπά το ανόργανο παραπροϊόν πυροφωσφορικό άλας από την αντίδραση επιμήκυνσης και εμποδίζει την συσσώρευση του η οποία μπορεί να αντιστρέψει την αντίδραση πολυμερισμού (αντίδραση πυροφωσφορυλίωσης).

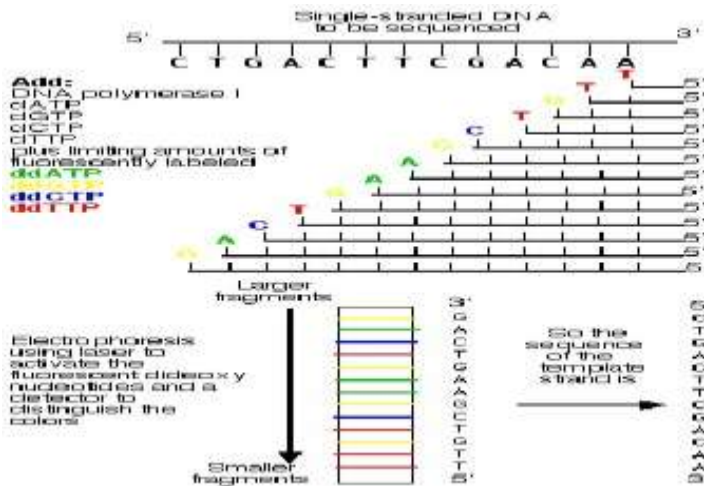
□ **Χλωριούχο Μαγνήσιο**

□ **Ρυθμιστικό Διάλυμα**

III. **Εκκινητής**, χρησιμοποιείται ο πρόσθιος (5') (forward) ή ο οπίσθιος (3') (reverse) εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της PCR.

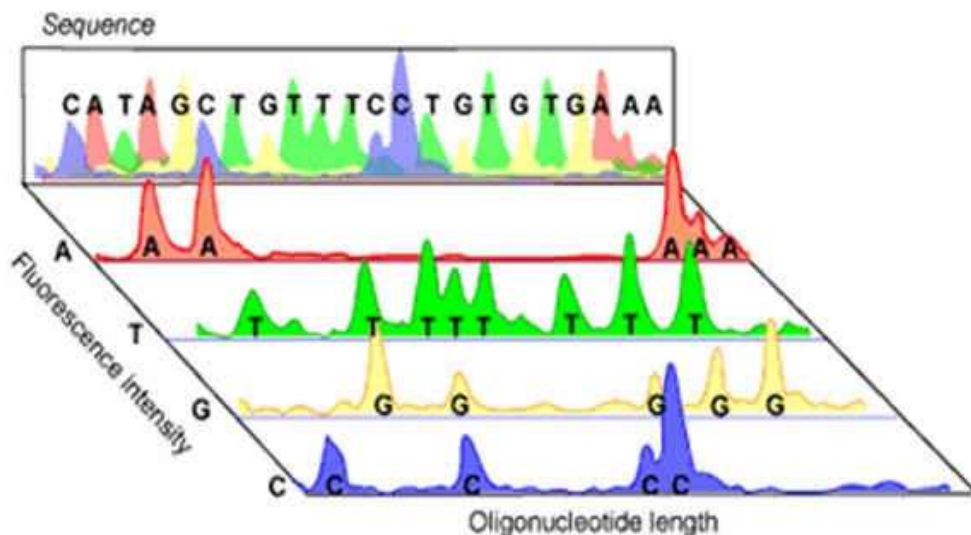
Η επιμήκυνση της αλυσίδας προχωράει κανονικά, επειδή και τα 4 νουκλεοτίδια είναι παρόν, έως ότου η DNA πολυμεράση εισάγει στην τύχη ένα διδεοξυ νουκλεοτίδιο (δείχνεται στην **Εικόνα 24** με χρωματισμένα γράμματα), αντί των κανονικών νουκλεοτιδίων (δείχνονται ως κάθετες γραμμές). Η επιμηκυνόμενη αλυσίδα ταυτόχρονα σταματάει και σημαίνεται από την χρωστική η οποία αντιστοιχεί στην βάση. Εάν ο λόγος dNTP/ddNTPs είναι αρκετά υψηλός, κάποιες αλυσίδες DNA θα καταφέρουν να προσθέσουν αρκετές εκατοντάδες νουκλεοτίδια πριν την εισαγωγή ενός δι-δεόξυ, ο οποίος θα σταματήσει την διαδικασία.

Μετά από πολλούς επαναλαμβανόμενους κύκλους επιμήκυνσης, θα έχει ως αποτέλεσμα, σε όλα τα πιθανά μήκη των τμημάτων DNA, να εκπροσωπείται κάθε τμήμα από μία φθορίζουσα σήμανση στο τέλος του.



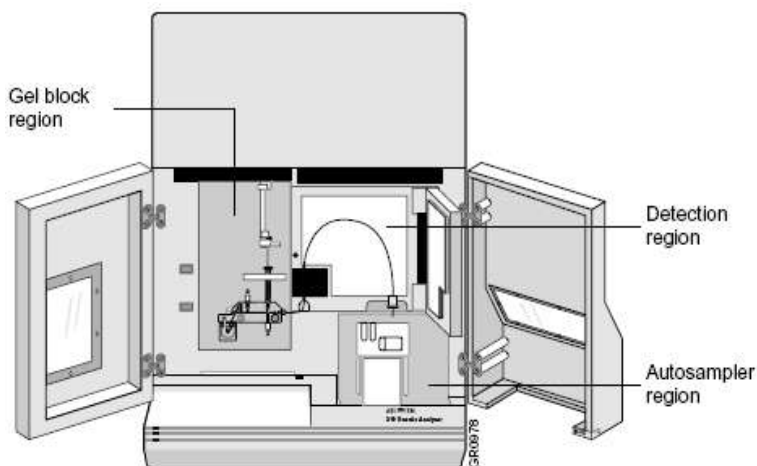
Εικόνα 24 : Η αντίδραση κυκλικής αλληλούχησης με την μέθοδο των σημασμένων χρωστικών λήξης (Dyeterminatorlabelling).

Τα σημασμένα τμήματα DNA μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθος τους μετά από ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή σωλήνα. Η ανάλυση είναι τόσο καλή ώστε το DNA διαχωρίζεται σε διαδοχικά τμήματα καθένα απ' τα οποία διαφέρει από το προηγούμενο του κατά μία μόνο βάση. Όταν τα φθορίζοντα τμήματα DNA φτάσουν στο τέλος της πηκτής προσπίπτουν σε μία δέσμη από μονοχρωματικό φως, η οποία εκπέμπεται από ένα laser. Αποτέλεσμα είναι να διεγείρεται κάθε τμήμα DNA και να εκπέμπει φθορισμό. Κάθε ένα από τα ddNTPs φθορίζει σε διαφορετικό μήκος κύματος όταν διεγερθεί από μονοχρωματικό φως και έτσι η παρουσία ενός ddNTPs στο άκρο μπορεί να καταγραφεί σε ένα Ηλεκτρονικό Υπολογιστή (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25 : Ηλεκτροφοριογράφημα μίας ολοκληρωμένης αντίδρασης αλληλούχησης. Καθώς τα κομμάτια αναλύονται διαμέσου της ηλεκτροφόρησης, ένα laser διαβάζει τον φθορισμό από κάθε κομμάτι (μπλε, πράσινο,κόκκινο ή κίτρινο) και συντάσσει τα στοιχεία σε μία εικόνα. Κάθε χρώμα ή ένταση φθορισμού αναπαριστά ένα διαφορετικό νουκλεοτίδιο (π.χ. μπλε για το C) και αποκαλύπτει που είναι το νουκλεοτίδιο στην αλληλουχία (Ανατύπωση από Helmut, 2003)

8. Συσκευή Αυτόματου Γενετικού Αναλυτή (ABIPRISM 310 GeneticAnalyzer) Εικόνα 26

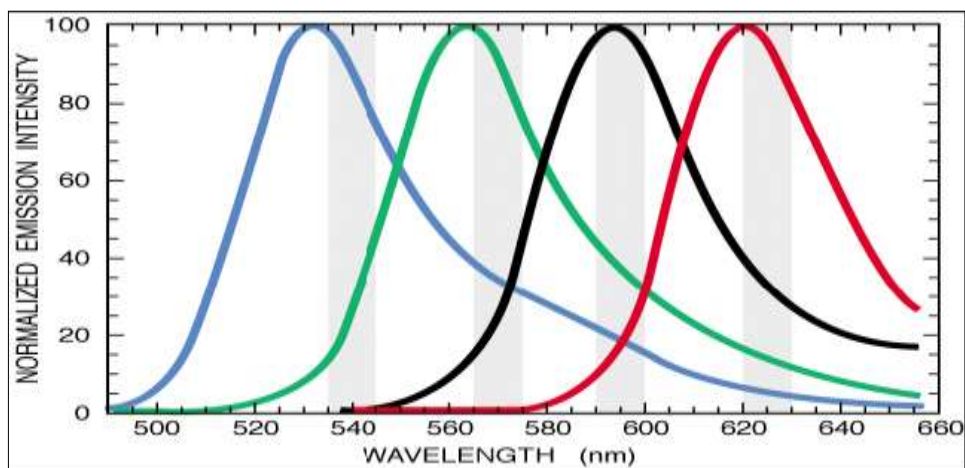


Εικόνα 26 : Η Συσκευή του αυτόματου αναλυτή ABIPRISM 310

Είναι ένα αυτοματοποιημένο όργανο για την ανάλυση τμημάτων DNA που φέρουν φθορίζουσες σημάσεις μέσω ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς. Τα δείγματα (μέχρι 48) που έχουν ολοκληρώσει την αλληλούχιση τοποθετούνται σε ένα αυτόματο δειγματολήπτη, ο οποίος διαδοχικά φέρνει κάθε ένα σε επαφή με ένα ηλεκτρόδιο καθόδου και με ένα υάλινο τριχοειδές μήκους 47 cm γεμισμένο με πολυμερές (POP 6). Το άλλο άκρο του τριχοειδούς και του ηλεκτρόδιου της ανόδου είναι εμβαπτισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα EDTA (1x) ειδικό για τον αναλυτή.

Όταν τα τμήματα DNA φθάσουν στο παράθυρο του ανιχνευτή του τριχοειδούς, το laser διεγείρει την φθορίζουσα σήμανση. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός από τις χρωστικές συλλέγεται κάθε δευτερόλεπτο σε συγκεκριμένες περιοχές μήκη κύματος, από μία ψυχή κάμερα που φέρει έναν ανιχνευτή, ο οποίος είναι μία συσκευή συζευγμένου φορτίου CCD (Charge-Coupled Device). Ο αισθητήρας CCD έχει την ικανότητα να δεσμεύει το ορατό φως και να παράγει ηλεκτρόνια. Το σχηματιζόμενο ρεύμα ηλεκτρονίων ενισχύεται ηλεκτρονικά, μετατρέπεται σε ψηφιακό και ακολούθως σε εικόνα στον υπολογιστή.

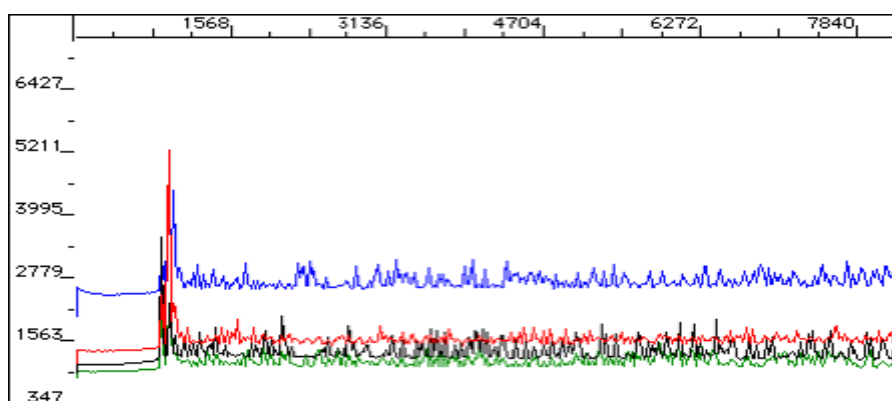
Το όργανο χρησιμοποιεί μία σειρά από φίλτρα προκειμένου να ανιχνεύσει την ένταση του φωτός στις τέσσερις μη επικαλυπτόμενες περιοχές της CCD κάμερας. Κάθε περιοχή ταιριάζει σε μία εμβέλεια μήκους κύματος η οποία περιέχει ή είναι κοντά στο μέγιστο εκπομπή της χρωστικής. Η σειρά των φίλτρων που χρησιμοποιείται για την συμβατότητα της χημείας Big Dye Terminator είναι η E (Εικόνα 27).





Εικόνα 27 : Φασματική επικάλυψη των χρωστικών της dRhodamine (κατακόρυφες γκρι ράβδοι) της σειράς των φίλτρων E. (Ανατύπωση από Chemistry Guide, Automated DNA sequencing, 1998)

Με το πρόγραμμα συλλογής στοιχείων (ABIPRISM 310 DataCollectionSoftwareversion 1.0.4), συλλέγονται τα μη επεξεργασμένα στοιχεία (τιμήματα DNA επισημασμένα με φθορισμό) από την CCD. Το πρόγραμμα περιέχει πληροφορίες για το φάσμα εκπομπής των χρωστικών και το μέγεθος των τμημάτων (Εικόνα 28).



Εικόνα 28 : Ηλεκτροφοριογράφημα μη επεξεργασμένων στοιχείων μίας επιτυχημένης αντίδρασης.

Στην συνέχεια τα δεδομένα αποθηκεύονται ως ψηφιακά σήματα για επεξεργασία. Το πρόγραμμα ανάλυσης αλληλούχισης (SequencingAnalysisSoftwareversion 3.3) επεξεργάζεται τα δεδομένα και μετατρέπει το φάσμα εκπομπής σε αλληλουχία DNA. Επίσης απομονώνει το σήμα από κάθε χρωστική έτσι ώστε να υπάρχει ελάχιστος θόρυβος, οριοθετεί τις βάσεις ώστε να απέχουν μεταξύ τους σε κανονικά διαστήματα, εφαρμόζει διορθώσεις κινητικότητας και καθορίζει το σημείο εκκίνησης της ανάλυσης.

Στόχος είναι να ληφθούν καλά ηλεκτροφοριογραφήματα με τα εξής χαρακτηριστικά :

- Καλοσχηματισμένες κορυφές και καλή ανάλυση. Το σχήμα των κορυφών να μην είναι πλατύ και ασύμμετρο και η κάθε μία κορυφή να διαχωρίζεται καλά από την άλλη.

- Καλό καθαρίσµα των προϊόντων της αντίδρασης κυκλικής αλληλούχισης για την αποφυγή κορυφών προερχόµενες από µη δεσµευµένες σηµασµένες χρωστικές στην αρχή του ηλεκτροφοριογραφήµατος, οι οποίες προκαλούν χαµηλό σήµα.
- Αυξηµένη αναλογία σήµατος – θορύβου µε όσο το δυνατόµετο λιγότερο Ns.
- Οµοιόµορφο σήµα σε όλο το ηλεκτροφοριογράφηµα χωρίς πρόµη πτώση του (βαθµιαία ή/και απότοµη).

9. Ετοιµασία των προϊόντων της κυκλικής αλληλούχισης για ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς :

Οι µη δεσµευµένες χρωστικές Big Dye Terminator θα πρέπει να αφαιρεθούν πριν τα δείγµατα αναλυθούν για ηλεκτροφόρηση.

Χρησιµοποιήθηκε το εµπορικό διαθέσιµο προϊόν της QiagenDyeEx™ 2.0 SpinKit (Cat. No. 63206, 250 αντιδράσεις).

Πρωτόκολλο καθαρισµού των προϊόντων της αντίδρασης κυκλικής αλληλούχισης (QiagenDyeEx 2.0 SpinKit) :

Ελαφριά vortex στις στήλες φυγοκέντρησης για να αναζωογονηθεί η ρητίνη και χαλάρωση µισής στροφής στα καπάκια των στηλών. Στην συνέχεια πραγµατοποιείται αποκόλληση του κλεισίµατος στον πυθµένα των στηλών και τοποθέτησή τους σε ένα 2 ml σωληνάκι παραλαβής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στις 2800 rpm και Μεταφορά της κάθε στήλης σε ένα καθαρό eppendorf. Μετά πραγµατοποιείται προσθήκη 10 µl απεσταγµένου H₂O σε κάθε δείγµα της αντίδρασης (για ευκολότερο χειρισµό και µείωση των λαθών για δείγµατα µικρότερα των 10 µl) και προσεκτικά µεταφορά στο κέντρο της επιφάνειας του gel. Στη συνέχεια πραγµατοποιείται φυγοκέντρηση για 3 min στις 2800 rpm. Ακολουθεί απομάκρυνση των φυγοκεντρικών στηλών από τα eppendorfs. Το εκχύλισµα περιέχει το καθαρισµένο DNA και ακολουθεί στέγνωµα των δειγµάτων σε φυγόκεντρο κενού

Να σηµειωθεί ότι η φυγοκέντρηση των στηλών γίνεται σε 750 x g σε µία συµβατική φυγόκεντρο. Η κατάλληλη ταχύτητα µπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο $g = 11,18 \times r (\text{rpm}/1000)^2$. Όπου g = επιτάχυνση, rpm = περιστροφές ανά λεπτό και r = ακτίνα της κεφαλής της φυγόκεντρος σε cm.

Ετοιµασία και φόρτωµα των δειγµάτων για ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς :

Πραγµατοποιείται προσθήκη 25 µl Highly Deionized Formamide (P/N 4311320C) σε κάθε δείγµα, για να αποφευχθούν τµήµατα DNA µε υψηλά µοριακά βάρη να εγχυθούν µέσα στο τριχοειδές και να προκαλέσουν απόφραξη, ενώ ακολουθεί ανάδευση σε vortex και θέρµανση στους 95 °C και κατέβασµα της θεµοκρασίας στον πάγο. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και σύντοµη περιστροφή σε µικροφυγόκεντρο ενώ µετά ακολουθεί µεταφορά του κάθε δείγµατος σε eppendorf των 0,5 ml και τοποθέτηση του ειδικού πλαστικού καλύµµατος προκειµένου να εµποδιστεί η εξάτµιση των δειγµάτων, ειδικά αυτών που θα καθυστερήσουν για ανάλυση περισσότερο από 6 ώρες. Στην συνέχεια έχουµε τοποθέτηση των δειγµάτων στον αυτόµατο δειγµατολήπτη δειγµάτων του γενετικού αναλυτή

Να σηµειωθεί εδώ ότι σε θεµοκρασία δωματίου τα δείγµατα στο φορµαµίδιο είναι σταθερά για 48 ώρες ενώ τα δείγµατα µπορούν να διατηρηθούν στο φορµαµίδιο στην ψύξη για αρκετές εβδοµάδες πριν αναλυθούν στον γενετικό αναλυτή

Ηλεκτροφορητικές Συνθήκες

Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες του γενετικού αναλυτή με τις οποίες έτρεξαν τα δείγματα είναι :

- Θερμοκρασία ανάλυσης δειγμάτων 50 ° C
- Χρόνος έγχυσης (injectiontime) των δειγμάτων 30 sec
- Τάσηέγχυσης (injection voltage) 2,0 kV
- Χρόνος ανάλυσης (run time) 36 min
- Τάση ανάλυσης (run voltage) 15,0 Kv
- Ισχύς laser (laser power) 9,9 mW

Χαρακτηριστικά του Λογισμικού Ανάλυσης :

- Ρυθμίσεις των συνθηκών ανάλυσης (run module) Filter Set E : Seq POP6 Rapid (1ml) E, χρησιμοποιείται για την συλλογή των στοιχείων
- Διορθώσεις της κινητικότητας (mobilitycorrection) : DT 310 POP6{BDv3}v1.mob, χρησιμοποιείται για να εξισορροπεί διαφορές κινητικότητας των προϊόντων επιμήκυνσης εξαιτίας της παρουσίας των διαφορετικών χρωστικών
- Basecaller : ABI-CE1 version 3.2, πρόγραμμα το οποίο προσδιορίζει την ταυτότητα της κάθε βάσης σε μία αλληλούχιση
- Αρχείο οργάνου (instrumentormatrixfile) : matrixBigDyeversion 3, περιέχει πληροφορίες οι οποίες επιτρέπουν στο πρόγραμμα ανάλυσης να εξουδετερώνει και να διορθώσει την φασματική αλληλεπικάλυψη μεταξύ των χρωστικών όταν τα στοιχεία αναλύονται.

Συγκριτική Ανάλυση των αλληλουχιών με H/Y (*in silico*)

Μετά την λήψη των ηλεκτροφοριογραφημάτων, αυτά αρχειοθετούνται και υφίστανται επεξεργασία με το πρόγραμμα Chromasver. 1.5. Από κάθε ηλεκτροφοριογράφημα εξάγεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία και με την χρήση του διαδικτύου γίνεται πρόσβαση και online συγκριτική ανάλυση στον ιστιακό τόπο του **NCBI** στην τράπεζα δεδομένων **GenBank**, με τη βοήθεια του προγράμματος αναζήτησης ομοιότητας **BLAST**.

Συνήθως στην σύγκριση παρουσιάζονται αρκετά λάθη ή κενά μεταξύ της εξεταζόμενης αλληλουχίας και της πρότυπης της τράπεζας δεδομένων. Επομένως χρειάζονται να γίνουν διορθώσεις στην μελετώμενη αλληλουχία και επανεξέτασή της στην GenBank. Οι διορθώσεις χρειάζονται διότι αρκετές φορές το πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων του γενετικού αναλυτή κάνει λάθη, όπως δεν μπορεί να αναγνώσει μία προσθήκη ή μία έλλειψη, δεν έχει κάνει καλή ανάλυση και στο ηλεκτροφοριογράφημα ενώ θα έπρεπε να υπάρχουν δύο κορυφές υπάρχει μία ευρεία. Επίσης σε άλλες περιπτώσεις δεν μπορεί να διαχωρίσει το υψηλό υπόβαθρο (background) από το σήμα με αποτέλεσμα να μην μπορέσει να ταυτοποιήσει την βάση και εισάγει Ns.

Τελικά το αποτέλεσμα από την σύγκριση της κάθε μίας εξεταζόμενης αλληλουχίας με την αλληλουχία της βάσης δεδομένων καταγράφεται, διότι παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον αριθμό πρόσβασης (**AccessionNumber**) της γονιδιωματικής αλληλουχίας, με τον οποίο έχει κατοχυρωθεί στην βάση δεδομένων, για τα αποτελέσματα της σύγκρισης, όπως βαθμολόγηση, τον βαθμό ομοιότητας και τα κενά.

Σε κάθε εξεταζόμενη αλληλουχία χρωματίζεται η κωδική της περιοχή με κόκκινο χρώμα, για να είναι εύκολος και ευδιάκριτος ο διαχωρισμός από τις μη κωδικές περιοχές. Σε περιπτώσεις αμφιβολιών, προβλημάτων και μεταλλαγών, η περιοχή που μας ενδιαφέρει χρωματίζεται με κίτρινο χρώμα.

10. Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης αποτελεί διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή των μορίων RNA, σε μονόκλωνα μόρια DNA (cDNA). Η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αξιόπιστη για διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις, όπως είναι ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης, η εκλεκτική ενίσχυση RNA αλληλουχιών που προορίζονται για κλωνοποίηση και περαιτέρω μελέτη, αλλά και η διάγνωση γενετικών ασθενειών.

Στην παρούσα μελέτη η σύνθεση μονόκλωνων μορίων cDNA, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το RNA, πραγματοποιήθηκε με βάση τα τυποποιημένα αντιδραστήρια της εταιρίας Invitrogen και το πρωτόκολλο “ThermoscriptRT-PCRSystem”. Η αντίστροφη μεταγραφή έγινε με τη χρήση oligo-dT εκκινητή ή εναλλακτικά με τη χρήση εξειδικευμένων για το υπό μελέτη γονίδιο εκκινητές.

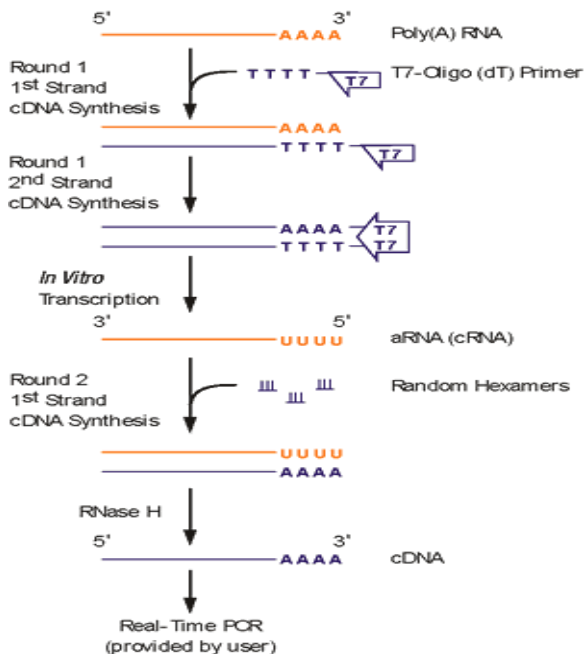
Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης προστέθηκαν σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorff τα ακόλουθα:

Υλικά	Ποσότητα
Μήτρα RNA (1μg)	9 μl
Εκκινητής oligo(dT) (50 mM) ή εξειδικευμένος για το γονίδιο εκκινητής (10 mM)	1 μl
10 mM dNTPs Mix	2 μl
Υπερκαθαρό νερό (DEPC-H ₂ O)	-

Μετά την αποδιάταξη του μίγματος σε θερμοκρασία 65°C για 5 min και την τοποθέτησή του στον πάγο, στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται:

Υλικά	Ποσότητα
5 X ρυθμιστικό διάλυμα (cDNA Synthesis Buffer)	4 μl
0,1 M DTT	1 μl
Αναστολέας ριβονουκλεασών (RNaseOUT) (40 U/μl)	1 μl
Υπερκαθαρό νερό (DEPC-H ₂ O)	1 μl
Μεταγραφάση (ThermoScript RT) (15U/ μl)	1 μl

Ακολούθησε επώαση του μίγματος στους 60°C για 1 ώρα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 85°C για 5 min. Το δείγμα αν δεν χρησιμοποιηθεί στην εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR), μπορεί να φυλαχθεί στους -20°C (Εικόνα 29).



Εικόνα 29 : Αναπαράσταση μηχανισμού αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφάσης.

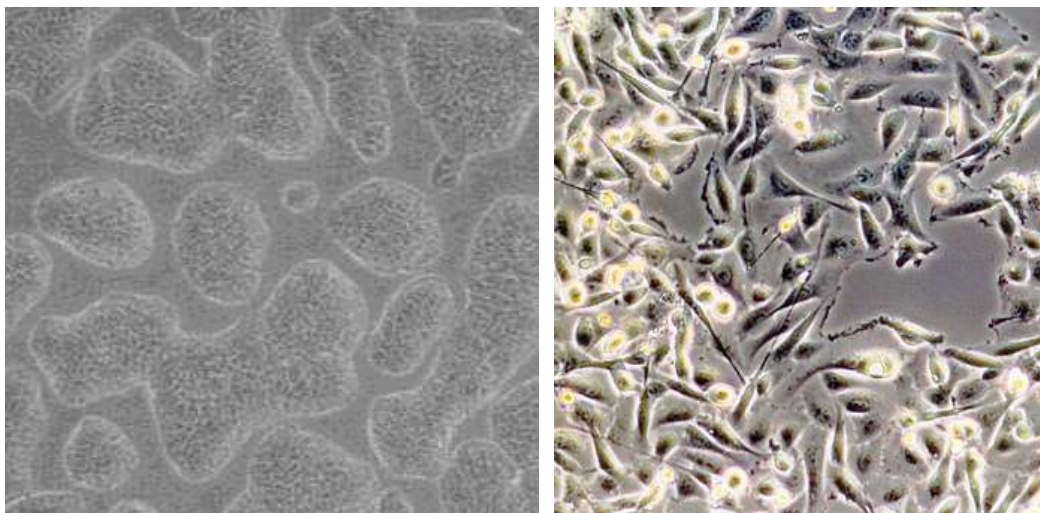
11. Κυτταροκαλλιέργειες

Κυτταρικές σειρές RT4 και T24

Τα καρκινικά κύτταρα των θηλαστικών μπορούν να καλλιεργηθούν και να αναπτυχθούν μέσα σε ένα τεχνητό υλικό, με την προϋπόθεση ότι θα βρουν πρόσφορη επιφάνεια για να προσκολληθούν, και να τους παρασχεθούν, σε κατάλληλες αναλογίες, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (πηγές άνθρακα, αζώτου, ιχνοστοιχεία κλπ.). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές RT4 και T24. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από ανθρώπινο, διαφοροποιημένο επιθήλιο ουροδόχου κύστης. Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα διαφορετικής διαβάθμισης και κακοήθειας, καθώς τα RT4 κύτταρα είναι διαβάθμισης 1 (grade I), ενώ τα T24 είναι καρκινικά κύτταρα διαβάθμισης 3 (grade III).

Τα κύτταρα RT4 είναι κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, καθώς διατηρούν πολλά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Πρόκειται στην ουσία για καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας και εντάσσονται στην διαβάθμιση 1. Τα κύτταρα αυτά έχουν σφαιρικό, ρομβοειδές σχήμα, ενώ στις καλλιέργειές τους τείνουν να σχηματίζουν δομές. Διατάσσονται δηλαδή σε νησίδες, οι οποίες μοιάζουν με ιστούς. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των RT4 κυττάρων είναι παρόμοιος με αυτόν των φυσιολογικών κυττάρων.

Αντίθετα, τα κύτταρα T24 είναι κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης, των οποίων η μορφολογία αποκλίνει πλήρως από τα φυσιολογικά κύτταρα του επιθηλίου της ουροδόχου κύστης. Μορφολογικά μοιάζουν με ινοβλάστες και παρουσιάζουν επίμηκες, ατρακτοειδές σχήμα, δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους με σκοπό να δημιουργήσουν συσσωματώματα και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, σχεδόν με διπλάσιο ρυθμό από αυτόν των grade 1 RT4 κυττάρων. Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας, πολύ επιθετικά και με υψηλό μεταστατικό δυναμικό (Εικόνα 30).



Εικόνα 30 : Αριστερά: Η κυτταρική σειρά RT4 (grade I) και Δεξιά: Η κυτταρική σειρά T24 (grade III).

Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται και αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο, κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες: σε θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95% (Εικόνα 31). Ο κλίβανος αποτελεί όργανο ύψιστης σημασίας για την σωστή ανάπτυξη των κυττάρων. Για το λόγο αυτό καθαρίζεται συστηματικά ανά τακτά χρονικά διαστήματα και στο εσωτερικό του προστίθεται αντισηπτικό σε ειδικό δοχείο, ώστε να διατηρούνται οι απαιτούμενες συνθήκες υγρασίας. Το εργαστήριο φροντίζει να έχει παρακολούθηση τον κλίβανο, κατά το ελάχιστο οι συνθήκες απαραίτητες διορθωτικές ρυθμίσεις.



Εικόνα 31 : Επωαστικός διατήρησης κλίβανος κυτταρικών σειρών.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται και για την διατήρηση και ανάπτυξη των δύο κυτταρικών σειρών είναι το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO, USA), το οποίο περιέχει γλυκόζη (4,5 mg/ml), σαν πηγή ενέργειας και ανθρακικών σκελετών, τα δέκα απαραίτητα αμινοξέα (αργινίνη, βαλίνη, θρεονίνη, ισολευκίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη) και βιταμίνες (χολίνη, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ, νικοτιναμίδιο, πυριδοξάλη, θειαμίνη), ενώ διατηρείται στους 4°C. Για την παρασκευή 50 ml πλήρους θρεπτικού διαλύματος DMEM προστίθεται ορός ενήλικου βοδιού [Fetal Bovine Serum - FBS, 10% (v/v)], ο οποίος θερμαίνεται στους 50°C για 30 min, προκειμένου να γίνει αδρανοποίηση των συστατικών του συμπληρώματος, μια διαδικασία γνωστή και ως «απενεργοποίηση» του ορού. Ο ορός περιέχει μεγάλα ποσά πρωτεϊνών (αλβουμίνη, σφαιρίνες), μικρά ποσά ορμονών (π.χ. ινσουλίνη), ίχνη αυξητικών παραγόντων [π.χ. αυξητικός παράγων αιμοπεταλικής προέλευσης (Platelet Derived Growth Factor: PDGF)] και αυξητικών συμπαραγόντων (π.χ. τρανσφαιρίνη). Επίσης, προστίθεται μίγμα αντιβιοτικών 100 U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη προς αποφυγή βακτηριακών μολύνσεων, L-γλουταμίνη (4 mM), διάλυμα άλατος πυροσταφυλικού νατρίου (1 mM) και διάλυμα (1,5 mg/ml) όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃). Τέλος, στο θρεπτικό υλικό προστίθεται και ποσότητα «μη απαραίτητων» αμινοξέων [Non Essential Amino Acids, 1% (v/v)], τα οποία απαιτούνται για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη έντονα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων.

Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε πλαστικές αποστειρωμένες φλάσκες επιφάνειας 25 cm² (Εικόνα 32) καθώς και σε πλαστικά τρυβλία (διαφόρων διαμέτρων, ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος). Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε κυτταρικής σειράς μια με τρεις φορές την εβδομάδα, σε συνάρτηση πάντα με τον ρυθμό αύξησης των κυττάρων. Για τη διατήρηση των κυτταρικών σειρών σε εκθετική φάση ανάπτυξης, η ανακαλλιέργειά τους κρίνεται απαραίτητη όταν η κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας από το “μονοκυτταρικό ταπήτιο” φτάνει περίπου το 70-80%, ώστε να ευνοείται η λειτουργικότητα, η επιβίωση και η ικανότητα διαφοροποίησής τους. Σε χαμηλή πυκνότητα παρατηρείται αυτόματη διαφοροποίηση, ενώ σε μεγάλη πυκνότητα παρατηρείται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός που οδηγεί σε αλλοιώσεις της μορφολογίας τους και τελικά σε χαμηλό δυναμικό διαφοροποίησης (Berg and McBurney, 1990).



Εικόνα 32 : Ειδικές πλαστικές φλάσκες επιφάνειας 25 cm² για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, γίνεται μετά από έκπλυσή τους με διάλυμα θρυψίνης – EDTA ή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (137 mM NaCl, 2,7 Mm KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4) και προσθήκη 1 ml διαλύματος θρυψίνης – EDTA (0,25% θρυψίνης / 0,53 mM EDTA). Μετά την επώαση των κυττάρων στους 37°C για μικρό χρονικό διάστημα (ανάλογα με τον τύπο της κυτταρικής σειράς) με το παραπάνω διάλυμα, πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων από το στερεό τους υπόστρωμα (κάτι που φαίνεται και μετά από παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, αφού τα κύτταρα αρχίζουν να συρρικνώνονται, να ξεχωρίζουν και να αποκολλώνται). Ο χρόνος αποκόλλησης των κυττάρων από το στερεό υπόστρωμα είναι μεταβλητός παράγοντας (διαφέρει από κυτταρικό τύπο σε κυτταρικό τύπο), με αποτέλεσμα τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας να χρειάζονται συνήθως μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επώασης από ότι τα πιο επιθετικά, τα οποία αποκολλώνται μέσα σε λίγα λεπτά.

Η ενζυμική αντίδραση της θρυψίνης τερματίζεται με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου το οποίο περιέχει την ενδεδειγμένη ποσότητα ορού ενήλικου βοός. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα, διαμοιράζονται σε νέες φλάσκες ή τρυβλία καλλιέργειας πραγματοποιώντας τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις και αραιώσεις, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Ο αριθμός διπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού (population doublings) προσδιορίζεται με βάση το μαθηματικό τύπο: $\log N / \log 2$, όπου N είναι ο αριθμός των κυττάρων σε μια πλήρη καλλιέργεια διαιρούμενος με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων που τοποθετήθηκαν στη φλάσκα (Εικόνα 33).



Εικόνα 33 : Αριστερά: εργαστηριακός θάλαμος νηματικής ροής (laminar hood). και δεξιά: ανάστροφο μικροσκόπιο.

Για την ορθή λειτουργικότητα και ικανότητα διαφοροποίησης των κυτταρικών σειρών είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται κύτταρα που έχουν διαιρεθεί λίγες φορές στην καλλιέργεια (Bain et al., 1994; Jones-Villeneuve et al., 1982) λόγω αποφυγής μεταλλάξεων οι οποίες είναι δυνατό να προέλθουν από παρατεταμένη καλλιέργεια με αποτέλεσμα να έχουμε διαφοροποίηση του πληθυσμού. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η δομική και λειτουργική ακεραιότητα των κυττάρων που καλλιεργούμε, καθώς τα κύτταρα που έχουν υποστεί υπέρ του δέοντος ανακαλλιέργειες χάνουν πολλά από τα φαινοτυπικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά που αρχικά διέθεταν. Όσο περνούν οι γενιές, το στρες από τις συνεχείς «θρυψινοποιήσεις» και ο κίνδυνος μόλυνσεων αυξάνουν κατακόρυφα τον κίνδυνο να αλλοιωθεί η λειτουργική ακεραιότητα των κυττάρων στις καλλιέργειες. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητο να υπάρχουν πάντοτε διαθέσιμα κύτταρα μικρής γενιάς σε ψύξη.

Τα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης μπορούν να διατηρηθούν σε υγρό άζωτο (-196°C), για μεγάλο χρονικό διάστημα, μειώνοντας σημαντικά τον μεταβολισμό τους. Έτσι διατηρούνται στην κατάσταση που βρίσκονται κατά τη στιγμή της κατάψυξης.

Η κατάψυξη πραγματοποιείται με συγκεκριμένη διαδικασία, σταδιακά (4°C, -20°C, -80°C, -196°C), με τη χρησιμοποίηση ειδικού διαλύματος, το οποίο περιέχει την κρυο-προστατευτική ουσία διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO). Το DMSO έχει την ικανότητα να μειώνει το σημείο τήξης του διαλύματος, σύμφωνα με όσα αναγράφονται σε πρωτόκολλα σχετικά με το χειρισμό κυτταροκαλλιιεργειών (Ausubel, 1991; Freshney, 1993; Spector et al., 1998). Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας, με την διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί) και ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- ✱ Επαναιώρηση των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκέντρηση στις 700 στροφές/min, για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✱ Αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού.
- ✱ Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1-2 ml κατάλληλου υγρού κατάψυξης [Freezing Medium - περιέχει 20% FBS και 10% DMSO (v/v)].
- ✱ Τοποθέτηση των κυττάρων σε ειδικές πλαστικές αποστειρωμένες αμπούλες (cryovials), στις οποίες αναγράφεται ο τύπος των κυττάρων καθώς και η ημερομηνία κατάψυξής τους.
- ✱ Οι αμπούλες τοποθετούνται αρχικά για 10 min στον πάγο.
- ✱ Μεταφορά και επώαση για 1 ώρα στους -20°C, για 16 ώρες στους -80°C και τέλος,
- ✱ Μεταφορά τους σε ειδικό δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο (-196°C), όπου γίνεται και η φύλαξή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Σε αντίθεση με την διαδικασία της κατάψυξης, που επιβάλλει σταδιακή και αργή μείωση της θερμοκρασίας, για την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται ταχεία μετάβαση από την εξαιρετικά χαμηλή θερμοκρασία του υγρού αζώτου στην θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή στους 37°C. Έτσι, η αμπούλα με τα παγωμένα κύτταρα τοποθετείται απευθείας στους 37°C (σε υδατόλουτρο ή στον κλίβανο), μέχρι να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, και αφού βεβαιωθούμε πως τα κύτταρα έχουν φτάσει σε θερμοκρασία 37°C, τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκα καλλιέργειας που περιέχει 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού θερμοκρασίας 37°C και τοποθετούνται στον κλίβανο. Καθώς το DMSO είναι τοξική ουσία για τα κύτταρα, κρίνεται απαραίτητη η αλλαγή του θρεπτικού υλικού μετά από 12-18 ώρες, για την πλήρη απομάκρυνσή του από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

12. Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικό εκχύλισμα

Η απομόνωση RNA από τα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης γίνεται με βάση την ακόλουθη διαδικασία. Αρχικά τοποθετούνται τα τρυβλία σε επιφάνεια η οποία έχει προηγουμένως καθαριστεί διεξοδικά με αιθανόλη. Στην συνέχεια προστίθεται σε κάθε τρυβλίο 0,8-1 ml διαλύματος TRIzol, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C). Η τριζόλη (TRIzol reagent) έχει την ιδιότητα να αποκολλά τα κύτταρα από το στερεό υπόστρωμα. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και γίνεται συλλογή των κυττάρων με την βοήθεια ειδικών scrappers, και τοποθετούνται σε ειδικά eppendorffs. Μετά πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12000 στροφές, για 10 λεπτά, στους 4°C και μεταφέρεται το υπερκείμενο σε καινούγιο falcon δοχείο. Σε αυτή τη φάση τα κύτταρα δύναται να διατηρηθούν στους -80°C. Κατά την συνέχεια προστίθενται περίπου 0,2 ml (160 µl) χλωροφόρμιο. Έτσι δημιουργούνται δύο φάσεις στο διάλυμα, με τις πρωτεΐνες να εντοπίζονται στη μέση και το RNA στην ανώτερη υδατική φάση. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 15 sec (με το χέρι ή με vortex) και επώαση για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές, στους 4°C, για 15 λεπτά και το υπερκείμενο (450-500 µl) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθενται 500 µl διαλύματος ισοπροπανόλης, η οποία είναι υπεύθυνη για την κατακρήμιση του RNA. Στην συνέχεια τοποθετούμε τα δείγματα στους -20° C overnight και την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12000 στροφές, στους 4°C, για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται στην πελλέτα 1ml (ή 800 µl) διαλύματος αιθανόλης 75%. Γίνεται γρήγορη ανάδευση και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 7500 στροφές, στους 4°C, για 5 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 5-10 λεπτά. Μετά προστίθεται ποσότητα RNase-free νερού (200µl) και γίνεται διάλυση, αραίωση του RNA και στην συνέχεια προστίθενται 20 µl διαλύματος 3M Sodium Acetate, με pH 5.2 (0,1 vol.). Στην συνέχεια προστίθενται 550 µl απόλυτης αιθανόλης (100%) και τα δείγματα επωάζονται overnight στους 30°C. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρούνται τα δείγματα στις 12000 στροφές, στους 4°C, για 15 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500 µl αιθανόλη 70%. Τα δείγματα μετά φυγοκεντρούνται στις 12000 στροφές, στους 4°C, για 15 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και αφήνεται το δείγμα να στεγνώσει στον αέρα για περίπου 10 λεπτά. Το RNA διαλύεται σε RNase-free νερό (50 µl) και το διάλυμα τοποθετείται για 10 λεπτά στους 55-60°C (διαλυτοποιούνται και αποδιατάσσονται οι δευτεροταγείς δομές). Τελικά τα δείγματα αποθηκεύονται στους -70°C.

13.Ανοσοϊστοχημεία

Η πειραματική μέθοδος που εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, είναι η ανοσοϊστοχημεία. Πρόκειται για τεχνική που πρωτοεφαρμόστηκε το 1974, και κατά την οποία ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται προκειμένου να συνδέσει ειδικά κάποιο ιστικό αντιγόνο με μια χρώση, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος παραλλαγών, όσο αφορά στον τύπο του δείγματος ιστών, τις συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης αντιγόνου - αντισώματος, καθώς και το σύστημα ανίχνευσης. Στην εν λόγω μελέτη έγινε προσπάθεια να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός συνδυασμός των παραπάνω επιλογών.

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος που πραγματοποιείται σε κάποιο ιστό, μπορεί να θεωρηθεί ότι ξεκινάει αμέσως μετά τη χειρουργική εξαίρεσή του δείγματος, με την έννοια ότι περιλαμβάνει και την κατάλληλη διαδικασία προετοιμασίας του υλικού προς εξέταση. Θεμελιώδες στάδιο της προετοιμασίας είναι η **μονιμοποίηση** των ιστών, που αποσκοπεί στη διατήρησή τους σε κατάσταση παρόμοια με εκείνη που βρίσκονται εν

ζωή, προστατεύοντας τους παράλληλα από τις δυσμενείς συνθήκες της περαιτέρω επεξεργασίας και πειραματικής μεθόδου. Η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται με την εμβάπτιση των τμημάτων ιστού σε κάποιο υγρό μέσο. Το μονιμοποιητικό μέσο που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην Παθολογική Ανατομική είναι η **φορμαλδεΐδη**, η οποία είναι καλά ανεκτή από τους ιστούς και έχει μεγάλη διεισδυτικότητα. Το κλινικό υλικό της παρούσας μελέτης έχει μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% για 24 ώρες.

Τη μονιμοποίηση ακολουθεί η παρασκευή τομών του υλικού. Οι δύο πιο κοινές επιλογές είναι οι **κατεψυγμένες** τομές και οι τομές **παραφίνης**. Οι πρώτες, που διατηρούνται σε υγρό άζωτο, επιτρέπουν εξαιρετική διατήρηση των αντιγόνων, ανεξάρτητα από το μέσο μονιμοποίησης. Συχνότερα όμως χρησιμοποιούνται οι τομές ιστών που έχουν εμπεδωθεί σε παραφίνη, κυρίως στις περιπτώσεις αρχειακών δειγμάτων. Το πλεονέκτημα αυτών των τομών είναι η πολύ καλή μορφολογική λεπτομέρεια και ανάλυση. Οι ιστοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, είχαν εμπεδωθεί σε κύβους παραφίνης. Από τους τελευταίους, με τη χρήση μικροτόμου, λήφθηκαν τομές πάχους 4μm, οι οποίες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, ειδικά φορτισμένες με θετικό φορτίο, που έχει αποτέλεσμα την ισχυρή σύνδεση μεταξύ τομών ιστού και αντικειμενοφόρου. Η παραπάνω ιδιότητα είναι σημαντική για τη συγκράτηση των τομών πάνω στις πλάκες κατά την εκτέλεση της μεθόδου, δεδομένου ότι επικρατούν αντίξοες φυσικές και χημικές συνθήκες.

Οι τομές ιστών, πριν αρχίσει η διαδικασία της σήμανσης με το ειδικό αντίσωμα, υφίστανται αποπαραφίνωση με θέρμανση, εμβάπτισή τους σε ξυλόλη και ενυδάτωση σε κάθοδο διαλυμάτων αιθανόλης. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, το σύστημα ανίχνευσης του αντισώματος που έχει προσδεθεί στους ιστούς, βασίζεται σε χημική αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση, το οποίο είναι τεχνητά συνδεδεμένο στο αντίσωμα. Επειδή όμως η δραστηριότητα υπεροξειδάσης είναι κοινή ιδιότητα όλων των αιμοπρωτεϊνών, όπως αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη, κυτοχρώματα και καταλάσες, τελικά θα παραχθεί σήμα και από μη ειδικές περιοχές. Είναι επομένως αναγκαίο να κατασταλαλεί η ενδογενής υπεροξειδάση των ιστών, γεγονός που επιτυγχάνεται με κορεσμό του ενζύμου με H₂O₂.

Κανονικά το επόμενο στάδιο είναι η επώαση των τομών με το ειδικό πρωτεύον αντίσωμα. Η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος η οποία πραγματοποιείται κατά την ανοσοϊστοχημεία, είναι σαφώς πιο περίπλοκη από αντιδράσεις του ίδιου τύπου που λαμβάνουν χώρα σε μεθόδους όπως η ανοσοκαθίζηση και η Western Blotting. Στην πρώτη περίπτωση, το ελεύθερο μόριο ανοσοσφαιρίνης συνδέεται με μόριο αντιγόνου, το οποίο είναι καθηλωμένο σε τομή ιστού και αλληλεπιδρά με μια ποικιλία μακρομορίων, κατά τρόπο μη κατανοητό. Επιπλέον, κατά τη μονιμοποίηση των τομών ιστού σε φορμόλη, τα περισσότερα αντιγόνα υφίστανται σημαντική βλαπτική επίδραση, που οδηγεί σε αλλαγή της σύστασης ή διαμόρφωσής τους. Πιθανόν η χημική τροποποίηση του πρωτεϊνικού αντιγόνου εξαιτίας της μονιμοποίησης, να πραγματοποιείται μέσω **crosslinking** αντιδράσεων. Πρόκειται για διαδικασία που περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση δύο μοριακών τμημάτων, η οποία μεσολαβείται από τη δράση ειδικών αντιδραστηρίων, όπως η φορμαλδεΐδη. Η χημική πορεία της μονιμοποίησης μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια. Η πρώτη αντίδραση είναι προσθήκη στη φορμαλδεΐδη :



Ακολουθεί η αντίδραση συμπύκνωσης :



Οι παραπάνω αντιδράσεις εξηγούν το σχηματισμό πολλαπλών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών σε τομές ιστών, μέσω της δημιουργίας γεφυρών μεθυλενίου (- CH₂ -), ανάμεσα σε πλευρικές ομάδες των μεγαλομορίων. Οι γέφυρες μεθυλενίου, καθώς και άλλες συνδέσεις που δεν έχουν κατανοηθεί ακόμα, μεταβάλλουν τη στερεοδομή των μακρομορίων. Τα αντισώματα όμως αναγνωρίζουν ειδικούς επίτοπους, οι οποίοι εντοπίζονται σε συγκεκριμένη χωρική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Συνεπώς η χημική τροποποίηση λόγω της μονιμοποίησης σε φορμαλδεΐδη, είναι δυνατό να καλύψει την αντιγονικότητα των ιστών, οπότε η αντίδραση με το αντίσωμα είναι πλέον αδύνατη ή εξαιρετικά δύσκολη.

Η τροποποίηση της πρωτεϊνικής δομής που παρατηρείται μετά την κατεργασία με φορμαλδεΐδη, είναι δυνατό, υπό ορισμένες συνθήκες, να αναστραφεί. Πράγματι, η δευτεροταγής, τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης, εξαρτάται από την αλληλουχία αμινοξέων της. Η τελευταία, κατά τη μονιμοποίηση δεν μεταβάλλεται, τουλάχιστον μέσω των crosslinking μηχανισμών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Εφόσον η πρωτοταγής δομή παραμένει ανέπαφη, είναι δυνατό να επανέρθει και η αρχική τρισδιάστατη διάταξη, με την εφαρμογή ιδανικής μεθόδου. Η **ανάκτηση αντιγόνου** είναι ένα σύνολο τεχνικών που μεγιστοποιούν τη διαθεσιμότητα ενός ιστικού αντιγόνου προκειμένου να αλληλεπιδράσει με το ειδικό αντίσωμα. Οι δύο πιο συνηθισμένες τεχνικές είναι η ενζυμική πέψη και η θέρμανση.

Ενζυμική πέψη : Περιλαμβάνει επώαση των τομών με κάποιο πρωτεολυτικό ένζυμο, όπως προνάση, θρυψίνη ή πεψίνη. Στόχος είναι να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες, ώστε τα ένζυμα να διασπάσουν ορισμένους από τους δεσμούς που σχηματίζονται κατά τη μονιμοποίηση, αποκαλύπτοντας αντιγονικές θέσεις, χωρίς βέβαια να γίνει πλήρης πέψη του αντιγόνου. Παρουσιάζει το μειονέκτημα πως τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι ικανά να καταργήσουν την αντιδραστικότητα μερικών αντιγόνων²¹⁸. Συγκριτικά με τα υπόλοιπα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό, η πεψίνη επιτυγχάνει αρκετά εκτενέστερη αποκάλυψη των αντιγόνων, ενώ συγχρόνως ελαττώνει τη μη ειδική δραστηριότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Η πρωτεολυτική μέθοδος με τη χρήση **πεψίνης**, επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία για ανάκτηση του αντιγόνου **PTEN**.

Θέρμανση: Ισχυρή θέρμανση τομών ιστού, εμβαπτισμένων σε ρυθμιστικά διαλύματα με κατάλληλο pH, παρέχει εντυπωσιακά αποτελέσματα ως προς την ανάκτηση του αντιγόνου²¹⁵. Διαφορετικές μέθοδοι θέρμανσης έχουν χρησιμοποιηθεί, με πιο διαδεδομένες την ακτινοβολία σε **κλίβανο μικροκυμάτων** και τη χρήση **χύτρας πιέσεως**. Η τελευταία φαίνεται να υστερεί ελαφρά στη διατήρηση υψηλής κυτταρολογικής λεπτομέρειας των τομών. Η ανάκτηση αντιγόνου μέσω θέρμανσης τομών παραφίνης σε κλίβανο μικροκυμάτων έχει πλέον εδραιωθεί ως μέθοδος^{219, 220} και εφαρμόστηκε και στην παρούσα εργασία, για τα αντιγόνα PPAR γ , RXR α , p65 και COX-2. Ο μηχανισμός ανάκτησης μπορεί να περιγραφεί από τα παρακάτω σημεία²²¹ :

- Διάσπαση των crosslinking δεσμών που έχουν σχηματιστεί από τη δράση της φορμαλδεΐδης, ανάμεσα στους επίτοπους του υπό εξέταση αντιγόνου και άσχετες πρωτεΐνες.
- Εκχύλιση των πρωτεϊνών με ικανότητα διάχυσης, που εμποδίζουν την πρόσβαση στις αντιγονικές θέσεις.
- Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.
- Επανυδάτωση των τομών, η οποία επιτρέπει μεγαλύτερη διείσδυση του αντισώματος και αυξημένη προσέγγιση στους επίτοπους.

Το αποτέλεσμα της θέρμανσης των ιστών στην ανάκτηση του αντιγόνου εμφανίζει θετική συσχέτιση ως προς το γινόμενο “ T x t ”, της θερμοκρασίας στην οποία παραμένουν οι τομές, με το χρόνο παραμονής. Για παράδειγμα, σε χαμηλότερη θερμοκρασία απαιτείται περισσότερος χρόνος, προκειμένου να επιτευχθεί το ίδιο ανοσοϊστοχημικό αποτέλεσμα. Εντούτοις, γενικά έχει παρατηρηθεί πως οι υψηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε καλύτερα αποτελέσματα²¹⁵. Στην παρούσα μελέτη, οι τομές θερμαίνονται σε υψηλές τιμές ισχύος του κλιβάνου, για σχετικά μικρά χρονικά διαστήματα.

Αν και η θέρμανση των ιστών αποτελεί το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό της τεχνικής του κλιβάνου μικροκυμάτων, η αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων, τουλάχιστον για μερικά αντιγόνα, προϋποθέτει μια ιδανική τιμή pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Έχει διαπιστωθεί πως για αρκετά πυρηνικά αντιγόνα, όπως ER, PR, pRB και MIB1, η ένταση ανοσοϊστοχημικής χρώσης είναι ισχυρότερη, όταν χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα σχετικά χαμηλού pH, με πιο διαδεδομένη την τιμή 6^{215, 222}. Η τιμή pH φαίνεται να αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο του ρυθμιστικού διαλύματος, ακόμα και σε σχέση με την ίδια τη σύσταση του διαλύματος²²². Επιπλέον, εκτός κάποιων ειδικών περιπτώσεων, πχ όταν το διάλυμα περιέχει $AlCl_3$ ²²³, για τα υπόλοιπα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ανάκτηση αντιγόνου με χρήση κλιβάνου μικροκυμάτων, η μοριακότητα επηρεάζει πολύ λίγο το αποτέλεσμα²¹⁵. Αν και η χημική σύνθεση του διαλύματος πιθανόν να έχει ρόλο συν-παράγοντα στη διαδικασία ανάκτησης, πρέπει να σημειωθεί ότι προς το παρόν δεν έχει αναγνωριστεί το ιδανικό ρυθμιστικό διάλυμα. Σήμερα, χρησιμοποιούνται ευρύτατα τα διαλύματα κιτρικών ιόντων, EDTA και Tris-HCl, με το πρώτο να είναι το πιο συνηθισμένο. Για την παρούσα εργασία, επιλέχθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών ιόντων συγκέντρωσης 0,01M και τιμής pH=6.

Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται με το πρωτεύον αντίσωμα, που συνδέεται με το αντιγόνο υπό μελέτη. Η δεύτερη κατηγορία, περιλαμβάνει στο ίδιο διάλυμα πολλές υποομάδες αντισωμάτων που αντιδρούν με διαφορετικούς επίτοπους του ίδιου αντιγόνου. Οι μηχανισμοί κάλυψης, μέσω μονιμοποίησης, αλλά και ανάκτησης, δεν είναι όμως δυνατό να επηρεάζουν όλους τους επίτοπους στον ίδιο βαθμό. Αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα, που διαθέτουν μία μόνο δυνατότητα αντίδρασης με ένα συγκεκριμένο επίτοπο παρέχουν πολύ πιο σαφή αποτελέσματα. Τα πρωτεύοντα αντισώματα της παρούσας εργασίας είναι **τα μονοκλωνικά anti-pAKT, anti-PTEN**. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων καθορίστηκαν με κριτήρια την εντονότερη δυνατή ειδική χρώση, σε συνδυασμό με χαμηλότερο θόρυβο (μη ειδική χρώση background). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα TBS, που περιέχει 1% Bovine Serum Albumin (BSA), με σκοπό την αποφυγή μη ειδικής δέσμευσης του αντισώματος. Από τις δύο συνεχόμενες τομές που είχαν επικοληθεί σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα, μόνο η μία επωάστηκε με το πρωτεύον αντίσωμα, ενώ η άλλη, η οποία καλύφθηκε με TBS και υποβλήθηκε κανονικά σε όλα τα υπόλοιπα στάδια της τεχνικής, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας της μεθόδου. Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες επώασης καθορίστηκαν μετά από δοκιμές, για κάθε αντίσωμα, στις τιμές του

Το επόμενο στάδιο είναι η ανίχνευση των αντισωμάτων που έχουν δεσμευτεί στους ιστούς. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές ανίχνευσης είναι ο **φθορισμός** και η **χρωμομετρική μέθοδος μέσω ενζύμου**, ενώ σπανιότερα χρησιμοποιούνται **σωματίδια χρυσού** ορατά στο φωτονικό μικροσκόπιο. Στο φθορισμό, κάποιο μόριο που εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία, συνδέεται τεχνητά στο αντίσωμα και γίνεται αντιληπτό στο μικροσκόπιο με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας και ειδικών φίλτρων. Η χρωμομετρική μέθοδος, που εφαρμόστηκε και στην παρούσα μελέτη, βασίζεται στη μετατροπή χρωμογόνου υποστρώματος από κάποιο ένζυμο προς έγχρωμο προϊόν, το οποίο κατακρημνίζεται. Στην εν λόγω εργασία χρησιμοποιήθηκαν το ένζυμο

υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase) και το χρωμογόνο υπόστρωμα **διάμινο βενζιδίνη (Diaminobenzidine ή DAB)**, που καταλήγουν στην παραγωγή προϊόντος αδιάλυτου στην αιθανόλη και χρώματος καφέ, το οποίο εντοπίζεται στο οπτικό μικροσκόπιο.

Προκειμένου να ανιχνευτούν τα αντισώματα που έχουν δεσμευτεί σε αντιγονικές θέσεις, είναι αναγκαίο να συνδεθεί σε αυτά με κάποια τεχνική το ένζυμο, ώστε με την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος, να παραχθεί στις ειδικές θέσεις το ορατό προϊόν. Το πρωτεύον αντίσωμα είναι δυνατό είτε να σημανθεί απευθείας με την υπεροξειδάση, είτε να ανιχνευτεί από δευτερεύον σημασμένο αντίσωμα. Στην τελευταία περίπτωση, το δευτερεύον αντίσωμα πρέπει να έχει παραχθεί εναντίον των ανοσοσφαιρινών του οργανισμού προέλευσης του πρωτεύοντος αντισώματος. Στην παρούσα εργασία, η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δευτερευόντων αντισωμάτων, έναντι των αντίστοιχων πρωτευόντων. Η πιο απλή και περισσότερο διαδεδομένη μέθοδος σήμανσης του δευτερεύοντος αντισώματος είναι η προσθήκη μορίων βιοτίνης σε αυτό. Η βιοτίνη παρουσιάζει ισχυρότατη χημική συγγένεια προς την πρωτεΐνη στρεπταβιδίνη. Η τελευταία, συνδεδεμένη με το ένζυμο υπεροξειδάση, αποτελεί το 3^ο αντιδραστήριο στην κλασική ανοσοϊστοχημική τεχνική (**Εικ. 34**).



Εικ. 34 : Ανοσοϊστοχημική μέθοδος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης.

Για το **pAKT** κρίθηκε αναγκαία η αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου με τη χρήση κάποιου συστήματος **Ενίσχυσης-Ανίχνευσης**, το οποίο αυξάνει σημαντικά την αναλογία σήματος προς αντίσωμα. Ειδικότερα, εφαρμόστηκε το σύστημα EnVision (Dako), όπου το δευτερεύον αντίσωμα είναι συνδεδεμένο σε σύμπλεγμα από μεγαλομόριο δεξτράνης, που φέρει μεγάλο αριθμό μορίων ενζύμου (**Εικ. 5**). Συνεπώς σε ένα μόριο πρωτεύοντος αντισώματος, αντιστοιχούν πολλά μόρια υπεροξειδάσης, με αποτέλεσμα ισχυρότατη αντίδραση παραγωγής έγχρωμου προϊόντος.

Ακολούθησε τοποθέτησή τους σε αιματοξυλίνη, για την αντίθετη μπλε χρώση των πυρήνων. Ύστερα οι τομές αφυδατώθηκαν σε άνοδο διαλυμάτων αιθανόλης και εμβαπτίστηκαν σε ξυλόλη. Το τελευταίο βήμα ήταν η επικάλυψή τους με καλυπτρίδα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μεταλλάξεις στην PI3KCA

Η προσπάθεια γονοτύπησης της πρωτεΐνης PI3KCA έδειξε μεταλλάξεις του γονιδίου σχετικές με τον καρκίνο της κύστης. Πιο συγκεκριμένα, Έγινε επεξεργασία των δεδομένων για 65 δείγματα με την σύγκριση των ηλεκτροφορογραφημάτων που προέκυψαν από την κυκλική αλληλούχιση και αναλύθηκαν με την χρήση του λογισμικού προγράμματος Chromas ver. 1.5. και αφορούν την μελέτη των δομικών αλλαγών στο γονίδιο *PIK3CA* για τα εξόνια 9 και 20.

- Σε ένα από τα 65 δείγματα που αναλύθηκαν βρέθηκε πολυμορφισμός σε μη κωδικοποιούσα περιοχή του ex9 της *PIK3CA*.
- Ο πολυμορφισμός που ανευρέθηκε σε ένα από τα 65 δείγματα, εντοπίζεται σε μη κωδικοποιούσα περιοχή της *PIK3CA* και εντοπίστηκε μακριά από EXON-INTRON BOUNDARY κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου.
- Βρέθηκαν μεταλλάξεις εντός της κωδικοποιούσας περιοχής της *PIK3CA*: Διαπιστώθηκαν τρεις παθογενετικές μεταλλάξεις (2 missense, 1 frameshift) στο εξόνιο 20 του *PIK3CA* {c.3140A>G (p.His1047Arg), c.[3172A>T(;)3174C>T] (p.Ile1058Phe), c.3203dupA (p.Asn1068Lysfs*5)}.

2. mRNA και περιβαλλοντικοί παράγοντες

- **Αποτελέσματα από τη σύγκριση του συνολικού δείγματος (mRna) με τα δημογραφικά στοιχεία**

Προκειμένου να βρεθεί η σχέση μεταξύ του p85, p110 και pTEN (έκφραση mRNA) σε σχέση με τους δημογραφικούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό τεστ για σύγκριση 2 διαμέσων τιμών Mann-Whitney U-test, το μη-παραμετρικό τεστ για σύγκριση 3 διαμέσων τιμών Kruskal-Wallis H-test και ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman r. Ειδικότερα, το Mann-Whitney U-test εφαρμόστηκε για τη συσχέτιση των δεικτών με το σύστημα σταδιοποίησης του όγκου, το φύλο, τις καπνιστικές συνήθειες, τις εγχύσεις, την υποτροπή και την έκθεση. Στη συνέχεια, το Kruskal-Wallis H-test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της σχέσης των δεικτών με την στάδιο του όγκου και ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman r για την συσχέτιση με την ηλικία και τον αριθμό των υποτροπών.

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ελέγχων και ειδικότερα προκύπτει πως υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του p85 (έκφραση mRNA) με το φύλο σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% (p-value= 0.013 < 0.05) και οριακά στατιστικά σημαντική σχέση με το σύστημα σταδιοποίησης του όγκου TNM και με το στάδιο (p-value= 0.066 και p-value= 0.06 0 < 0.10 αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως οι γυναίκες έχουν υψηλότερη διάμεση τιμή p85 (έκφραση mRNA) (2.75) σε σύγκριση με τους άντρες (0.74) , καθώς και πως οι ασθενείς με σταδιοποίηση του όγκου T2 παρουσιάζουν υψηλότερη διάμεση τιμή (0.71) σε σχέση με όσους έχουν στάδιο T1 (0.53). Δεν βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του p85 με τους υπόλοιπους παράγοντες: καπνιστικές συνήθειες, εγχύσεις, υποτροπή, έκθεση, αριθμός υποτροπών και ηλικία (p-value > 0.05).

p85_gardh		
Μεταβλητές	Διάμεση τιμή (25^ο -75^ο σημείο)	p-value
TNM		
<i>T1</i>	0.53 (0.39 – 0.75)	0.066 ^{1*}
<i>T2</i>	0.71 (0.60 – 0.92)	
Grade		
<i>G1</i>	0.42 (0.36 – 0.47)	0.060 ^{2*}
<i>G2</i>	0.77 (0.60 – 1.32)	
<i>G3</i>	0.76 (0.67 – 1.02)	
Φύλο		
<i>Άντρας</i>	0.74 (0.57 – 1.00)	0.013 ^{**}
<i>Γυναίκα</i>	2.75 (1.36 – 4.13)	
Κάπνισμα		
<i>Όχι</i>	0.77 (0.64 – 1.20)	0.470 ¹
<i>Ναι</i>	0.72 (0.48 – 1.18)	
Εγγύσεις		
<i>Όχι</i>	0.72 (0.51 – 0.90)	0.402 ¹
<i>Ναι</i>	0.84 (0.61 – 1.32)	
Υποτροπή		
<i>Όχι</i>	0.74 (0.38 – 1.36)	0.602 ¹
<i>Ναι</i>	0.75 (0.64 – 1.12)	
Έκθεση		
<i>Όχι</i>	0.75 (0.57- 1.27)	0.239 ¹
<i>Ναι</i>	0.64 (0.51 – 0.72)	
Συσχέτιση (r_s)		
Ηλικία (σε έτη)	0.14	0.524 ³
Υποτροπή (φορές)	0.03	0.903 ³

¹Mann – Whitney U-test

²Kruskal- Wallis H-test

³Spearman Correlation Coefficient (r_s)

* στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 10%

** στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%

Πίνακας 4. Μονοπαραγοντικές συσχετίσεις του p85 με τους δημογραφικούς παράγοντες.

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ελέγχων και ειδικότερα προκύπτει πως μόνο με την έκθεση υπάρχει οριακό στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (p -value= 0.057 < 0.10), ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του p110 και των υπολοίπων παραγόντων: TNM, στάδιο του όγκου, φύλο, καπνιστικές συνήθειες, εγχύσεις, υποτροπή, αριθμός υποτροπών και ηλικία (p -value > 0.05). Το ίδιο και στην περίπτωση που ελέγχουμε τη σχέση του pTEN με τα δημογραφικά στοιχεία (p -value > 0.05) (Πίνακας 6).

P110_gapdh		
Μεταβλητές	Διάμεση τιμή (25^ο -75^ο σημείο)	p-value
TNM		
<i>T1</i>	0.57 (0.39 – 0.75)	0.590 ¹
<i>T2</i>	0.54 (0.26 – 0.66)	
Grade		
<i>G1</i>	0.33 (0.14 – 0.56)	0.701 ²
<i>G2</i>	0.41 (0.21 – 0.50)	
<i>G3</i>	0.42 (0.26 – 1.15)	
Φύλο		
<i>Άντρας</i>	0.39 (0.18 – 0.54)	0.270 ¹
<i>Γυναίκα</i>	0.52 (0.46 – 0.57)	
Κάπνισμα		
<i>Όχι</i>	0.38 (0.23 – 0.63)	0.663 ¹
<i>Ναι</i>	0.42 (0.21 – 0.50)	
Εγχύσεις		
<i>Όχι</i>	0.38 (0.16 – 0.46)	0.157 ¹
<i>Ναι</i>	0.46 (0.28 – 0.68)	
Υποτροπή		

<i>Όχι</i>	0.41 (0.22 – 0.48)	0.549 ¹
<i>Ναι</i>	0.41 (0.21 – 0.68)	
Έκθεση		
<i>Όχι</i>	0.41 (0.17 – 0.54)	0.057 ^{1*}
<i>Ναι</i>	0.39 (0.36 – 0.42)	
Συσχέτιση (r_s)		
Ηλικία (σε έτη)	0.08	0.710 ³
Υποτροπή (φορές)	-0.05	0.832 ³

¹Mann – Whitney U-test

²Kruskal- Wallis H-test

³Spearman Correlation Coefficient (r_s)

* στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%

Πίνακας 5. Μονοπαραγοντικές συσχετίσεις του p110 με τους δημογραφικούς παράγοντες.

PTEN_gardh		
Μεταβλητές	Διάμεση τιμή (25^ο -75^ο σημείο)	p-value
TNM		
<i>T1</i>	0.39 (0.24 – 0.53)	0.155 ¹
<i>T2</i>	0.32 (0.22 – 0.65)	
Grade		
<i>G1</i>	0.05 (0.37 – 1.15)	0.273 ²
<i>G2</i>	0.29 (0.18 – 0.45)	
<i>G3</i>	0.26 (0.17 – 0.68)	
Φύλο		
<i>Άντρας</i>	0.26 (0.17 – 0.50)	0.689 ¹
<i>Γυναίκα</i>	0.38 (0.34 – 0.41)	
Κάπνισμα		
<i>Όχι</i>	0.32 (0.21 – 0.48)	0.978 ¹
<i>Ναι</i>	0.26 (0.17 – 0.50)	
Εγγύσεις		

<i>Όχι</i>	0.24 (0.16 – 0.42)	0.265 ¹
<i>Ναι</i>	0.41 (0.21 – 0.50)	
Υποτροπή		
<i>Όχι</i>	0.32 (0.16 – 0.50)	0.892 ¹
<i>Ναι</i>	0.26 (0.20 – 0.46)	
Έκθεση		
<i>Όχι</i>	0.38 (0.18 – 0.50)	0.434 ¹
<i>Ναι</i>	0.24 (0.17 – 0.29)	
Συσχέτιση (r_s)		
Ηλικία (σε έτη)	0.03	0.880 ³
Υποτροπή (φορές)	0.001	0.998 ³

¹Mann – Whitney U-test

²Kruskal- Wallis H-test

³Spearman Correlation Coefficient (r_s)

* στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%

Πίνακας 6. Μονοπαραγοντικές συσχετίσεις του pTEN με τους δημογραφικούς παράγοντες

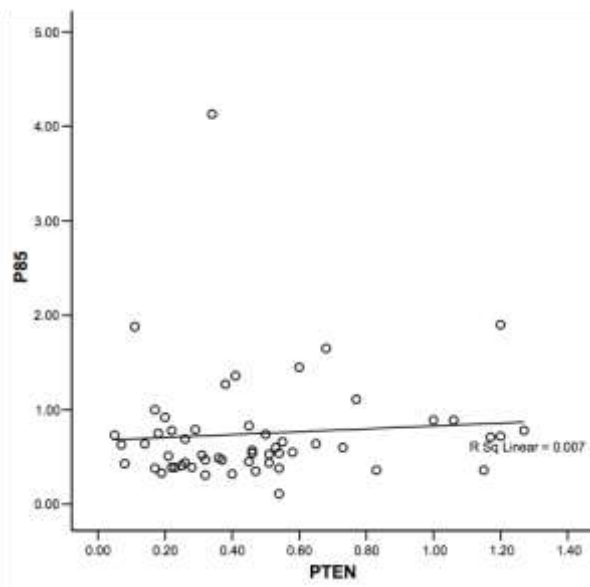
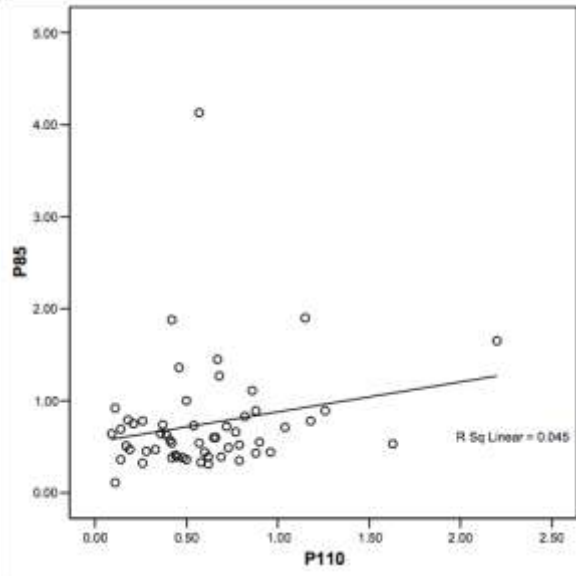
3.Συσχέτιση επιπέδων mRNA μεταξύ των τριών υπό μελέτη γονιδίων

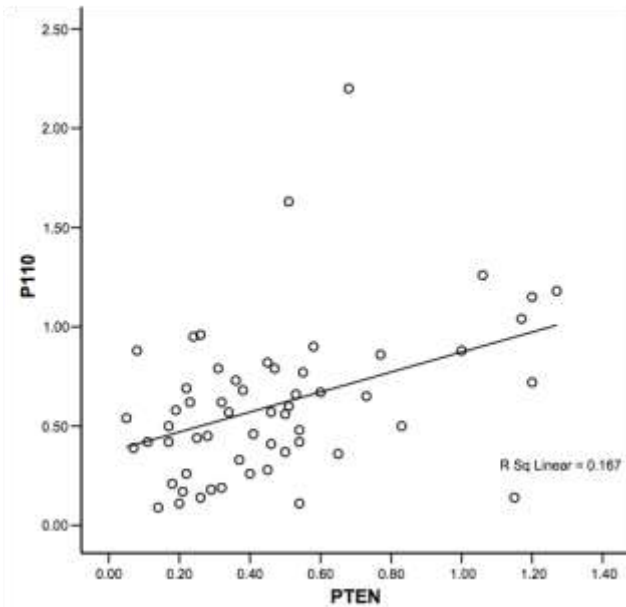
Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι συσχετίσεις των δεικτών ανά δύο μεταξύ τους. Για τον έλεγχο χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman r και φαίνεται πως οι δείκτες που συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους είναι ο p110 και pTEN (r= 0.40, p-value= 0.002< 0.05). Αυτό σημαίνει πως υπάρχει θετική σημαντική συσχέτιση των δεικτών p110 και pTEN, δηλαδή όσο αυξάνεται ο p110 αυξάνεται και ο pTEN και αντιστρόφως. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από το Γράφημα 33. Τα υπόλοιπα ζεύγη δεικτών p85-p110 και p85-pTEN δεν συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (p-value> 0.05).

	Spearman Coefficient (r_s)	Correlation p-value
p85_gapdh - p110_gapdh	0.20	0.150
p85_gapdh - pTEN_gapdh	0.14	0.324
p110_gapdh - pTEN_gapdh	0.40	0.002*

* στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%

Πίνακας 7. Συσχετίσεις ανά δύο μεταξύ των δεικτών.





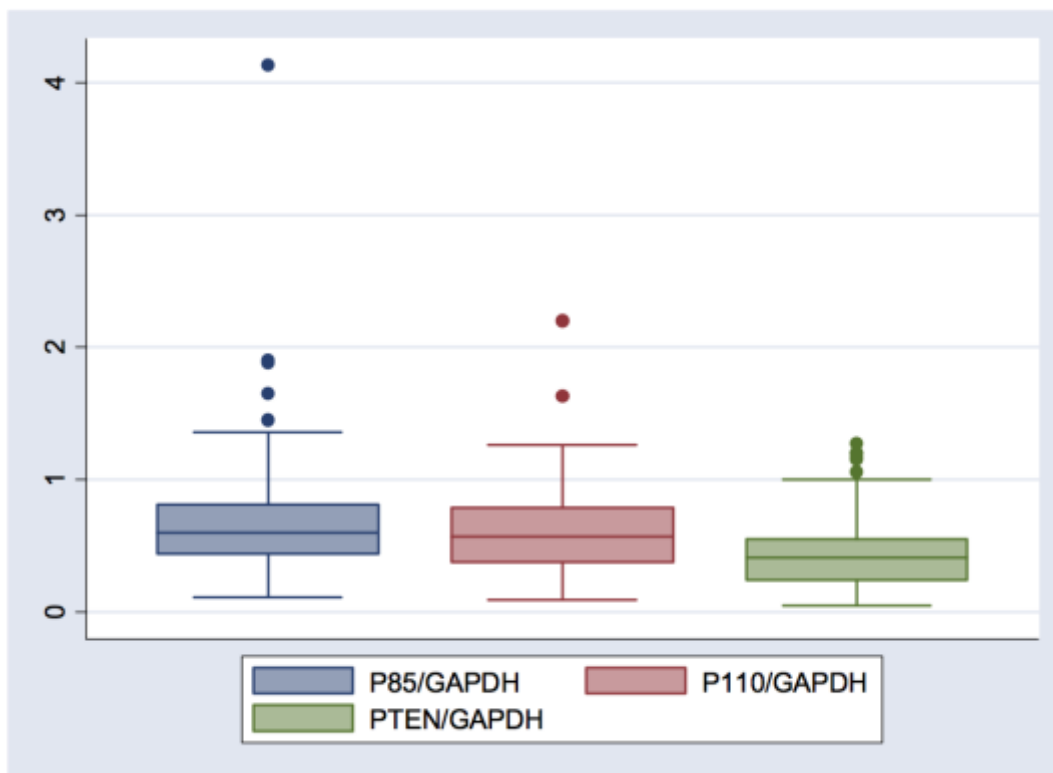
Εικόνα 36. Διαγράμματα συσχέτισης p85, p110, pTEN (ανά δύο).

Στον Πίνακα 24 φαίνεται η σύγκριση των 3 δεικτών μεταξύ τους. Για τον έλεγχο αυτό εφαρμόστηκε ο μη-παραμετρικός έλεγχος για σύγκριση 3 διαμέσων τιμών Kruskal-Wallis H-test. Από το τεστ προέκυψε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των διαμέσων τιμών μεταξύ των 3 δεικτών ($p\text{-value} < 0.001$). Στο Γράφημα 34 απεικονίζονται τα τεταρτημόρια, ελάχιστη-μέγιστη τιμή και κάποιες ακραίες τιμές για τους 3 δείκτες.

	Διάμεση τιμή	25 ^ο – 75 ^ο σημείο	Ελάχιστη – Μέγιστη Τιμή	
p85_gapdh	0.60	0.44 – 0.81	0.11 - 4.13	
p110_gapdh	0.57	0.37 – 0.79	0.09 – 2.2	Kruskal Wallis* p-value < 0.001
pTEN_gapdh	0.41	0.24 – 0.55	0.05 – 1.27	

* στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%

Πίνακας 8. Σύγκριση διαμέσων τιμών και των 3 δεικτών μεταξύ τους.



Εικόνα 37. Θηκόγραμμα για τους 3 δείκτες.

4.Αποτελέσματα σύγκρισης φυσιολογικών – καρκινικών ιστών για την έκφραση σε επίπεδο mRNA των μελετούμενων γονιδίων

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της σύγκρισης φυσιολογικών-καρκινικών ιστών. Από τον Πίνακα 9 φαίνεται ότι το p85 στους φυσιολογικούς ιστούς εκφράζεται με υψηλότερη διάμεση τιμή σε σχέση με τους καρκινικούς όγκους, το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση που μελετάμε τους δείκτες p110 και pTEN. Το ποσοστό των καρκινικών όγκων που είναι κάτω από τη διάμεση τιμή των αντιστοίχων φυσιολογικών έχει ως εξής: στο p85 το 78% των καρκινικών όγκων είναι μικρότεροι απ'τη διάμεση τιμή (0.72) των φυσιολογικών, στο p110 το 83% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη διάμεση τιμή (0.81) των φυσιολογικών και στο pTEN το 91% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη διάμεση τιμή (0.75) των φυσιολογικών. Η σύγκριση των διαμέσων τιμών στο p110 και στο pTEN μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών όγκων δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%. Όταν εξετάζουμε τη μέση τιμή μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών, τότε τα αποτελέσματα είναι προς την ίδια κατεύθυνση. Συγκεκριμένα, στο p85 το 63% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.67) των φυσιολογικών, στο p110 το 83%* των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.81) των φυσιολογικών, στο pTEN το 91%** των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.81) των φυσιολογικών. Η σύγκριση των μέσων τιμών στο p110 και στο pTEN μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών όγκων δίνει επίσης στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% (t-test p-value= 0.036 και p-value< 0.001 αντίστοιχα). Δηλαδή, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της μέσης τιμής του p110 και pTEN στο mRNA μεταξύ των φυσιολογικών ιστών και των όγκων και ειδικότερα η μέση τιμή των

φυσιολογικών ιστών είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των καρκινικών.

Φυσιολογικοί		Μέση τιμή (SD)	Διάμεση τιμή
n= 13	P85/GAPDH	0.67 (0.257)	0.72
	P110/GAPDH	0.81 (0.097)	0.81
	P10/GAPDH	0.81 (0.108)	0.75
Όγκοι		Μέση τιμή	Διάμεση τιμή
n= 60	P85/GAPDH	0.77 (0.096)	0.56
61	P110/GAPDH	0.56 (0.057)	0.50
61	P10/GAPDH	0.40 (0.038)	0.34

Πίνακας 9. Βασικά περιγραφικά στοιχεία φυσιολογικών και καρκινικών ιστών.

Παρακάτω, παρουσιάζεται η σχέση της έκφρασης RT4 με p85, p110 και pTEN. Για το p85 προκύπτει ότι το 83% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.08. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value= 0.003), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους όγκους σε σχέση με την τιμή του RT4. Για το p110 ότι το 96% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.33. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό (p-value< 0.001), αυτό σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους όγκους σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του RT4. Όσο αφορά στο pTEN το 91% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 0.76. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value< 0.001), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης pTEN στους όγκους σε σχέση με την τιμή του RT4.

Επιπλέον, προκύπτει για το p85 το 90% των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.08. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value= 0.015), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4. Για το p110 το 100% (13) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.33 και προκύπτει στατιστικά σημαντικό το αποτέλεσμα (p-value< 0.001), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4. Τέλος για το pTEN το 50% των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 0.76. Ωστόσο, δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης pTEN στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4 (p-value= 0.68 >0.05).

Ακολουθεί η συσχέτιση έκφρασης T24 με p85, p110 και pTEN. Για το p85 φαίνεται πως το 65% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.71. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value= 0.039), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους όγκους σε σχέση με

την τιμή του T24. Για το p110 το 94% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 1.12. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό (p-value < 0.001), αυτό σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους όγκους σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του T24. Όσο αφορά στο pTEN το 23% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.21. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value < 0.001), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης pTEN στους όγκους σε σχέση με την τιμή του T24.

Στη συνέχεια, για το p85 το 50% των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.71. Το αποτέλεσμα ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντικό (p-value = 0.507 > 0.05), δηλαδή δεν προκύπτει σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24. Για το p110 το 80% (10) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 1.12, και προκύπτει στατιστικά σημαντικό το αποτέλεσμα (p-value = 0.01), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24. Τέλος για το pTEN το 0% των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.21 και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value < 0.001), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης pTEN στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24.

5. Σύγκριση μεταξύ καρκινικών ιστών ασθενών και καρκινικών σειρών και μεταξύ φυσιολογικών ιστών και καρκινικών σειρών

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της σύγκρισης φυσιολογικών-καρκινικών ιστών. Από τον Πίνακα 10 φαίνεται ότι το p85 στους φυσιολογικούς ιστούς εκφράζεται με υψηλότερη διάμεση τιμή σε σχέση με τους καρκινικούς όγκους, το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση που μελετάμε τους δείκτες p110 και pTEN. Το ποσοστό των καρκινικών όγκων που είναι κάτω από τη διάμεση τιμή των αντιστοιχών φυσιολογικών έχει ως εξής: στο p85 το 78% των καρκινικών όγκων είναι μικρότεροι απ'τη διάμεση τιμή (0.72) των φυσιολογικών, στο p110 το 83% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη διάμεση τιμή (0.81) των φυσιολογικών και στο pTEN το 91% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη διάμεση τιμή (0.75) των φυσιολογικών. Η σύγκριση των διαμέσων τιμών στο p110 και στο pTEN μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών όγκων δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%. Όταν εξετάζουμε τη μέση τιμή μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών, τότε τα αποτελέσματα είναι προς την ίδια κατεύθυνση. Συγκεκριμένα, στο p85 το 63% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.67) των φυσιολογικών, στο p110 το 83%* των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.81) των φυσιολογικών, στο pTEN το 91%** των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.81) των φυσιολογικών. Η σύγκριση των μέσων τιμών στο p110 και στο pTEN μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών όγκων δίνει επίσης στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% (t-test p-value = 0.036 και p-value < 0.001 αντίστοιχα). Δηλαδή, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της μέσης τιμής του p110 και pTEN στο mRNA μεταξύ των φυσιολογικών ιστών και των όγκων και ειδικότερα η μέση τιμή των φυσιολογικών ιστών είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των καρκινικών.

Φυσιολογικοί		Μέση τιμή (SD)	Διάμεση τιμή
n= 13	P85/GAPDH	0.67 (0.257)	0.72

	P110/GAPDH	0.81 (0.097)	0.81
	P10/GAPDH	0.81 (0.108)	0.75
Όγκοι		Μέση τιμή	Διάμεση τιμή
n= 60	P85/GAPDH	0.77 (0.096)	0.56
61	P110/GAPDH	0.56 (0.057)	0.50
61	P10/GAPDH	0.40 (0.038)	0.34

Πίνακας 10. Βασικά περιγραφικά στοιχεία φυσιολογικών και καρκινικών ιστών.

Παρακάτω, παρουσιάζεται η σχέση της έκφρασης RT4 με p85, p110 και pTEN. Για το p85 προκύπτει ότι το 83% (49) των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.08. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value= 0.003), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους όγκους σε σχέση με την τιμή του RT4. Για το p110 ότι το 96% (59) των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.33. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό (p-value< 0.001), αυτό σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους όγκους σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του RT4. Όσο αφορά στο pTEN το 91% (56) των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 0.76. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value< 0.001), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης pTEN στους όγκους σε σχέση με την τιμή του RT4.

Επιπλέον, προκύπτει για το p85 το 90% (12) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.08. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value= 0.015), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4. Για το p110 το 100% (13) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 1.33 και προκύπτει στατιστικά σημαντικό το αποτέλεσμα (p-value< 0.001), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4. Τέλος για το pTEN το 50% (7) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του RT4 = 0.76. Ωστόσο, δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης pTEN στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4 (p-value= 0.68 >0.05).

Ακολουθεί η συσχέτιση έκφρασης T24 με p85, p110 και pTEN. Για το p85 φαίνεται πως το 65% (39) των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.71. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value= 0.039), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους όγκους σε σχέση με την τιμή του T24. Για το p110 το 94% (57) των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 1.12. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό (p-value< 0.001), αυτό σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους όγκους σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του T24. Όσο αφορά στο pTEN το 23% (14) των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.21. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό (p-value< 0.001), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης pTEN στους όγκους σε σχέση με την τιμή του T24.

Στη συνέχεια, για το p85 το 50% (7) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.71. Το αποτέλεσμα ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντικό ($p\text{-value}=0.507 > 0.05$), δηλαδή δεν προκύπτει σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p85 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24. Για το p110 το 80% (10) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 1.12, και προκύπτει στατιστικά σημαντικό το αποτέλεσμα ($p\text{-value}=0.01$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24. Τέλος για το pTEN το 0% (0) των φυσιολογικών είναι μικρότεροι απ'τη τιμή του T24 = 0.21 και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p\text{-value} < 0.001$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης pTEN στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24.

6. Αποτελέσματα για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση και ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PAKT

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση και ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PAKT. Για τη συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT, καθώς και για τη σύγκρισή του με τους δημογραφικούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος X^2 του Pearson ή το Fisher's exact test.

Αρχικά, στον Πίνακα 11 φαίνονται οι συχνότητες και οι σχετικές συχνότητες στην περίπτωση που συσχετίζεται η ανοσοϊστοχημική έκφραση με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pAKT. Παρατηρούμε πως το 60% των περιπτώσεων με μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση έχουν έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση και το 50% των περιπτώσεων με κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική εντόπιση έχουν ασθενή ανοσοϊστοχημική έκφραση. Από τον έλεγχο φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση $p\text{-value} < 0.001$. Το παραπάνω ισχύει για το επιφανειακό, καθώς και στην περίπτωση που εξετάζουμε το διηθητικό υπάρχει στατιστική σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ποσοτικής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT ($p\text{-value}=0.002$). Ιδιαίτερα, από τον Πίνακα 12 φαίνεται ότι η πλειοψηφία των διηθητικών όγκων έχουν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση με ασθενή και μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Ανοσοϊστοχημική έκφραση					Fisher's exact p-value < 0.001
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	11 100.0%	0 0%	0 0%	0 0%	11	
Κυτταροπλασματική	0 0%	10 52.6%	4 21.1%	5 26.3%	19	
Πυρηνική	0 0%	1 50%	0 0%	1 50%	2	
Μικτή	0	6	7	20	33	

	0%	18.2%	21.2%	60.6%	
Σύνολο	11	17	11	26	65
	16.9%	26.2%	16.9%	40%	

Πίνακας 11. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pAKT (επιφανειακό).

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Ανοσοϊστοχημική έκφραση				Σύνολο	Fisher's exact p-value=0.002
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη		
Δεν εκφράζεται	5 100.0%	0 0%	0 0%	0 0%	5	
Κυτταροπλασματική	0 0%	0 0%	0 0%	1 100.0%	1	
Πορηγική	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0	
Μικτή	0 0%	5 36.4%	5 36.4%	4 27.3%	14	
Σύνολο	5 25.0%	5 25.0%	5 25.0%	5 25.0%	20	

Πίνακας 12. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pAKT (διηθητικό).

7. Αποτελέσματα σύγκρισης της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο pAKT με τα δημογραφικά στοιχεία

Ακολουθεί η σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και τα δημογραφικά στοιχεία. Στους Πίνακες 13 έως και 16 έγινε συσχέτιση του pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο. Από τους ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν προκύπτει πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση pAKT στο επιφανειακό, στο διηθητικό και στη συνολική ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης (p-value < 0.05). Επιπλέον, παρατηρούμε πως συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά η ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT με το στάδιο (p-value < 0.01).

pAKT (επιφανειακό)	Βαθμός διαφοροποίησης			Σύνολο	
	G1	G2	G3		
Αρνητική	0 0%	0 0%	0 0%	0	
Ασθενής	0 0%	5 36.4%	9 63.6%	14	Fisher's exact p-value=0.02
Μέτρια	1 12.5%	4 37.5%	5 50.0%	10	
Έντονη	3 10.0%	12 45.0%	12 45.0%	26	
Σύνολο	4 7.7%	21 41.0%	26 51.3%	51	

Πίνακας 13. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (επιφανειακό) με το βαθμό διαφοροποίησης.

pAKT (διηθητικό)	Βαθμός διαφοροποίησης			Σύνολο	
	G1	G2	G3		
Αρνητική	4 9.1%	18 48.5%	21 42.4%	43	
Ασθενής	0 0%	0 0%	4 100.0%	4	Fisher's exact p-value=0.02
Μέτρια	0 0%	0 0%	1 100.0%	1	
Έντονη	0 0%	0 0%	1 100.0%	1	
Σύνολο	4 7.9%	21 42.1%	25 50.0%	49	

Πίνακας 14. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (διηθητικό) με το βαθμό διαφοροποίησης.

pAKT Ανοσοϊστοχημική έκφραση	Βαθμός διαφοροποίησης			Σύνολο	
	G1	G2	G3		
Αρνητική	0 0%	0 0%	0 0%	0	
Ασθενής	3 13.3%	7 33.3%	10 53.3%	20	Fisher's exact p-value=0.026
Μέτρια	0 0%	1 8.3%	14 91.7%	15	
Έντονη	1 5.0%	14 55.0%	10 40.0%	25	
Σύνολο	4 6.4%	22 36.2%	34 57.4%	60	

Πίνακας 15. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (συνολικά) με το βαθμό διαφοροποίησης.

pAKT Ανοσοϊστοχημική έκφραση	Στάδιο		Σύνολο	
	T1	T2		
Αρνητική	0 0%	0 0%	0	
Ασθενής	8 40.0%	12 60.0%	20	Fisher's exact p-value<0.001
Μέτρια	1 6.7%	14 93.3%	15	
Έντονη	20 74.1%	7 25.9%	27	
Σύνολο	29 46.8%	33 53.2%	62	

Πίνακας 16. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (συνολικά) με το στάδιο.

Ακολουθούν οι Πίνακες 17 έως και 28, οι οποίοι παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των συσχετίσεων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT με τα δημογραφικά στοιχεία (κάπνισμα, εγχύσεις, υποτροπές, φύλο, έκθεση και ηλικία), ωστόσο δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p\text{-value} > 0.05$).

pAKT (επιφανειακό)	Κάπνισμα		Σύνολο	
	Όχι	Ναι		
Αρνητική	0	0	0	
	0%	0%		
Ασθενής	5	5	10	
	50.0%	50.0%		
Μέτρια	4	5	9	Fisher's exact p-value=0.90
	42.9%	57.1%		
Έντονη	13	9	22	
	58.8%	41.2%		
Σύνολο	22	20	42	
	53.1%	46.9%		

Πίνακας 17. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (επιφανειακό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

pAKT (διηθητικό)	Κάπνισμα		Σύνολο	
	Όχι	Ναι		
Αρνητική	20	16	36	
	55.6%	44.4%		
Ασθενής	0	3	3	Fisher's exact p-value=0.22
	0%	100.0%		
Μέτρια	0	1	1	
	0%	100.0%		

Έντονη	1 100.0%	0 .0%	1
Σύνολο	21 51.6%	20 48.4%	41

Πίνακας 18. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (διηθητικό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

pAKT (επιφανειακό)	Εγχύσεις			Fisher's exact p-value=0.90
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	0 0%	0 0%	0	
Ασθενής	4 37.5%	7 62.5%	11	
Μέτρια	5 57.1%	4 42.9%	9	
Έντονη	10 47.1%	12 52.9%	22	
Σύνολο	20 46.9 %	22 53.1 %	42	

Πίνακας 19. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (επιφανειακό) με τις εγχύσεις.

pAKT (διηθητικό)	Εγχύσεις			Fisher's exact p-value=0.85
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	16 44.4%	20 55.6%	36	
Ασθενής	1	1	2	

	50.0%	50.0%	
Μέτρια	1	0	1
	100.0%	0%	
Έντονη	0	1	1
	0%	100.0%	
Σύνολο	18	22	40
	45.2%	54.8%	

Πίνακας 20. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (διηθητικό) με τις εγχύσεις.

pAKT (επιφανειακό)	Υποτροπές			Fisher's exact p-value=0.64
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	0	0	0	
	0%	0%		
Ασθενής	5	5	10	
	50.0%	50.0%		
Μέτρια	5	4	9	
	57.1%	42.9%		
Έντονη	8	14	22	
	35.3%	64.7%		
Σύνολο	18	23	41	
	43.8	56.3		
	%	%		

Πίνακας 21. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (επιφανειακό) με τις υποτροπές.

pAKT (διηθητικό)	Υποτροπές			Fisher's exact p-value>0.999
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	16	20	36	
	44.4%	55.6%		

Ασθενής	1 50.0%	1 50.0%	2
Μέτρια	0 0%	1 100.0%	1
Έντονη	0 0%	1 100.0%	1
Σύνολο	17 41.9%	23 58.1%	40

Πίνακας 22. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (διηθητικό) με τις υποτροπές.

pAKT (επιφανειακό)	Φύλο			Fisher's exact p-value>0.999
	Άντρας	Γυναίκα	Σύνολο	
Αρνητική	0 0%	0 0%	0	
Ασθενής	13 90.9%	1 9.1%	14	
Μέτρια	10 100.0%	0 0%	10	
Έντονη	25 95.0%	1 5.0%	26	
Σύνολο	48 94.9%	3 5.1%	51	

Πίνακας 23. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (επιφανειακό) με το φύλο.

pAKT (διηθητικό)	Φύλο			Fisher's exact
	Άντρας	Γυναίκα	Σύνολο	
Αρνητική	40	3	43	

	93.9%	6.1%		p-value>0.999
Ασθενής	4	0	4	
	100.0%	0%		
Μέτρια	1	0	1	
	100.0%	0%		
Έντονη	1	0	1	
	100.0%	0%		
Σύνολο	47	3	50	
	94.7%	5.3%		

Πίνακας 24. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (διηθητικό) με το φύλο.

pAKT (επιφανειακό)	Έκθεση			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	0	0	0	
	0%	0%		
Ασθενής	10	0	10	Fisher's exact p-value= 0.59
	100.0%	0%		
Μέτρια	8	1	9	
	85.7%	14.3%		
Έντονη	18	3	21	
	87.5%	12.5%		
Σύνολο	36	4	40	
	90.3%	9.7%		

Πίνακας 25. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (επιφανειακό) με την έκθεση.

Έκθεση

ρΑΚΤ (διηθητικό)	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	31 92.3%	3 7.7%	34	
Ασθενής	3 100.0%	0 0%	3	Fisher's exact p-value= 0.20
Μέτρια	1 100.0%	0 0%	1	
Έντονη	0 0%	1 100.0%	1	
Σύνολο	35 90.0%	4 10.0%	39	

Πίνακας 26. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του ρΑΚΤ (διηθητικό) με την έκθεση.

ρΑΚΤ (επιφανειακό)	N	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη Τιμή	Μέγιστη Τιμή	ANOVA test (p-value)
Αρνητική	0	-	-	-	-	
Ασθενής	17	68.0	9.81	51	80	
Μέτρια	13	65.3	11.46	53	84	2.26 (0.12)
Έντονη	34	73.5	9.69	56	92	
Σύνολο	64	70.3	10.44	51	92	

Πίνακας 27. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του ρΑΚΤ (επιφανειακό) με την ηλικία (σε έτη).

ρΑΚΤ (διηθητικό)	N	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη Τιμή	Μέγιστη Τιμή	ANOVA test (p-value)
Αρνητική	56	70.6	10.71	51	92	
Ασθενής	4	71.5	0.71	71	72	
Μέτρια	1	78.0	-	78	78	0.17 (0.92)
Έντονη	1	70.0	-	70	70	
Σύνολο	62	70.8	10.17	51	92	

Πίνακας 28. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT (διηθητικό) με την ηλικία (σε έτη).

Παρακάτω, γίνεται σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με τη βαθμό διαφοροποίησης και τα δημογραφικά στοιχεία. Από τη σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με βαθμό διαφοροποίησης δεν προκύπτει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p\text{-value} > 0.05$) (Πίνακας 29). Αντίθετα, από τη σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με το στάδιο υπάρχει οριακά στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (επίπεδο σημαντικότητας 10%) (Πίνακας 30). Από τον Πίνακα 68 και 69 παρατηρούμε πως η ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο δεν συσχετίζονται σημαντικά.

pAKT	Βαθμός διαφοροποίησης				
	G1	G2	G3	Σύνολο	
Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση					
Δεν εκφράζεται	1	3	8	12	
	11.1%	22.2%	66.7%		
Κυτταροπλασματική	0	9	13	22	Fisher's exact p-value=0.463
	0%	41.2%	58.8%		
Πυρηνική	0	4	1	5	
	0%	75.0%	25.0%		
Μικτή	4	10	20	34	
	11.5%	30.8%	57.7%		
Σύνολο	5	26	42	73	
	7.1%	35.7%	57.1%		

Πίνακας 29. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης.

pAKT	Στάδιο			
	T1	T2	Σύνολο	
Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση				
Δεν εκφράζεται	8	4	12	
	66.7%	33.3%		
Κυτταροπλασματική	7	14	21	Fisher's exact p-value=0.063
	31.3%	68.8%		
	5	0	5	

Πυρηνική	100.0%	0%	
	20	14	34
Μικτή	57.7%	42.3%	
	40	32	72
Σύνολο	54.5%	45.5%	

Πίνακας 30. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με το στάδιο.

Στη συνέχεια, οι Πίνακες 31 έως και 40 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των συσχετίσεων της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με τα δημογραφικά στοιχεία (κάπνισμα, εγχύσεις, υποτροπές, φύλο, έκθεση και ηλικία), ωστόσο δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p\text{-value} > 0.05$).

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Κάπνισμα		Σύνολο	
	Όχι	Ναι		
Δεν εκφράζεται	3	3	6	
	50.0%	50.0%		
Κυτταροπλασματική	3	4	7	Fisher's exact p-value= 0.326
	40.0%	60.0%		
Πυρηνική	4	0	4	
	100.0%	0%		
Μικτή	8	13	21	
	37.5%	62.5%		
Σύνολο	18	20	38	
	46.4%	53.6%		

Πίνακας 31. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (επιφανειακό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Εγχύσεις		Σύνολο	
	Όχι	Ναι		
Δεν εκφράζεται	5	0	5	Fisher's exact

	100.0%	0%		p-value= 0.230
	4	3	7	
Κυτταροπλασματική	60.0%	40.0%		
	1	3	4	
Πυρηνική	33.3%	66.7%		
	9	12	21	
Μικτή	43.8%	56.3%		
	19	18	37	
Σύνολο	53.6%	46.4%		

Πίνακας 32. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (επιφανειακό) με τις εγχύσεις.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Υποτροπές			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	5	0	5	
	100.0%	0%		
	3	4	7	
Κυτταροπλασματική	40.0%	60.0%		Fisher's exact p-value= 0.210
	1	3	4	
Πυρηνική	33.3%	66.7%		
	9	12	21	
Μικτή	43.8%	56.3%		
	18	19	37	
Σύνολο	50.0%	50.0%		

Πίνακας 33. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (επιφανειακό) με τις υποτροπές.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Φύλο		Σύνολο	
	Άντρας	Γυναίκα		
Δεν εκφράζεται	7	0	7	
	100.0%	0%		
Κυτταροπλασματική	9	0	9	
	100.0%	0%		Fisher's exact p-value> 0.999
Πυρηνική	4	0	4	
	100.0%	0%		
Μικτή	20	3	23	
	88.2%	11.8%		
Σύνολο	40	3	43	
	93.8%	6.3%		

Πίνακας 34. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (επιφανειακό) με το φύλο.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Έκθεση		Σύνολο	
	Όχι	Ναι		
Δεν εκφράζεται	5	0	5	
	100.0%	0%		
Κυτταροπλασματική	7	0	7	
	100.0%	0%		Fisher's exact p-value= 0.521
Πυρηνική	3	1	4	
	66.7%	33.3%		
Μικτή	17	3	20	
	86.7%	13.3%		
Σύνολο	32	4	36	
	88.9%	11.1%		

Πίνακας 35. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (επιφανειακό) με την έκθεση.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Κάπνισμα			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0 0%	1 100.0%	1	
Κυτταροπλασματική	0 0%	0 0%	0	Fisher's exact p-value> 0.999
Πυρηνική	0 0%	0 0%	0	
Μικτή	3 50.0%	3 50.0%	6	
Σύνολο	3 40.0 %	4 60.0%	7	

Πίνακας 36. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (διηθητικό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Εγχύσεις			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0 0%	1 100.0%	1	
Κυτταροπλασματική	0 0%	0 0%	0	Fisher's exact p-value> 0.999
Πυρηνική	0 0%	0 0%	0	
Μικτή	1 25.0%	4 75.0%	5	
Σύνολο	1	5	6	

20.0
% 80.0%

Πίνακας 37. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (διηθητικό) με τις εγχύσεις.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Υποτροπές			Fisher's exact p-value> 0.999
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0 0%	1 100.0%	1	
Κυτταροπλασματική	0 0%	0 0%	0	
Πυρηνική	0 0%	0 0%	0	
Μικτή	1 25.0%	4 75.0%	5	
Σύνολο	1 20.0 %	5 80.0%	6	

Πίνακας 38. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (διηθητικό) με τις υποτροπές.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Φύλο		Σύνολο
	Άντρας	Γυναίκα	
Δεν εκφράζεται	1 100.0%	0 0%	1
Κυτταροπλασματική	1 100.0%	0 0%	1
Πυρηνική	0 0%	0 0%	0
	5	0	5

Μικτή	100.0%	0%	
	7	0	7
Σύνολο	100.0%	0%	

Πίνακας 39. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (διηθητικό) με το φύλο.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Έκθεση			Fisher's exact p-value > 0.999
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	1 100.0%	0 0%	1	
Κυτταροπλασματική	0 0%	0 0%	0	
Πυρηνική	0 0%	0 0%	0	
Μικτή	4 75.0%	1 25.0%	5	
Σύνολο	5 80.0%	1 20.0%	6	

Πίνακας 40. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT (διηθητικό) με την έκθεση.

8. Αποτελέσματα για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση και ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PTEN

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση και ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PTEN. Για τη συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του PTEN, καθώς και για τη σύγκρισή του με τους δημογραφικούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 του Pearson ή το Fisher's exact test.

Στον Πίνακα 41 και 42 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όταν πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω έλεγχοι για το pTEN. Όλες οι παρατηρήσεις στο επιφανειακό με πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση είχαν έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση, ενώ στο διηθητικό με πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση είχαν ασθενής ανοσοϊστοχημική έκφραση. Ωστόσο, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση

ανοσοϊστοχημικής εντόπισης και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (p-value>0.05).

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Ανοσοϊστοχημική Έκφραση				Σύνολο	Fisher's exact p-value<0.05
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη		
Δεν εκφράζεται	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0	
Κυτταροπλασματική	0 0%	8 22.9%	7 20%	20 57.1%	35	
Πυρηνική	0 0%	0 0%	0 0%	2 100.0%	2	
Μικτή	0 0%	7 25%	8 28.6%	13 46.4%	28	
Σύνολο	0 0%	15 23.1%	15 23.1%	35 53.8%	65	

Πίνακας 41. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pTEN (επιφανειακό).

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Ανοσοϊστοχημική Έκφραση				Σύνολο	Fisher's exact p-value>0.05
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη		
Δεν εκφράζεται	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0	
Κυτταροπλασματική	0 0%	1 33%	3 67%	0 0%	4	
Πυρηνική	1 13%	7 63%	1 13%	1 13%	10	
Μικτή	0 0%	7 56%	3 22%	3 22%	13	
Σύνολο	1	15	7	4	27	

5.0% 55.0% 25.0% 15.0%

Πίνακας 42. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pTEN (διηθητικό).

Ακολουθεί η σύγκριση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και τα δημογραφικά στοιχεία. Στους Πίνακες 50 έως 53, όσο αφορά στη συσχέτιση του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου παρατηρούμε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε όλες τις περιπτώσεις ($p\text{-value} < 0.05$) (Πίνακες 43 έως και 46).

pTEN (επιφανειακό)	Βαθμός διαφοροποίησης				Fisher's exact p-value= 0.002
	G1	G2	G3	Σύνολο	
Αρνητική	0 0%	1 20.0%	5 80.0%	6	
Ασθενής	3 25.0%	5 50.0%	3 25.0%	11	
Μέτρια	0 0%	0 0%	7 100.0%	7	
Έντονη	0 0%	14 78.6%	4 21.4%	18	
Σύνολο	3 6.3%	20 50.0%	19 43.8%	42	

Πίνακας 43. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με το βαθμό διαφοροποίησης.

pTEN (διηθητικό)	Βαθμός διαφοροποίησης				Fisher's exact p-value= 0.01
	G1	G2	G3	Σύνολο	
Αρνητική	3 6.9%	21 55.2%	14 37.9%	38	
Ασθενής	0	0	1	1	

	0%	0%	100.0%	
Μέτρια	0	0	3	3
	0%	0%	100.0%	
Έντονη	0	0	3	3
	0%	0%	100.0%	
Σύνολο	3	21	21	45
	5.9%	47.1%	47.1%	

Πίνακας 44. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (διηθητικό) με το βαθμό διαφοροποίησης.

pTEN	Βαθμός διαφοροποίησης				
	Ποσοτική έκφραση	G1	G2	G3	
Αρνητική	0	0	0	0	
	0%	0%	0%		
Ασθενής	1	8	30	39	
	3.3%	20.0%	76.7%		Fisher's exact p-value= 0.001
Μέτρια	1	8	18	27	
	4.8%	28.6%	66.7%		
Έντονη	4	17	23	44	
	8.8%	38.2%	52.9%		
Σύνολο	6	33	71	110	
	5.9%	29.4%	64.7%		

Πίνακας 45. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (συνολικά) με το βαθμό διαφοροποίησης.

PTEN	TNM			
	Ποσοτική έκφραση	T1	T2	
Αρνητική	0	0	0	
	0%	0%		Fisher's exact p-value=

Ασθενής	14	25	39	0.045
	36.7%	63.3%		
Μέτρια	13	14	27	
	47.6%	52.4%		
Έντονη	30	14	44	
	67.6%	32.4%		
Σύνολο	57	53	110	
	51.8	48.2		
	%	%		

Πίνακας 46. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (συνολικά) με το TNM.

Στη συνέχεια, οι Πίνακες 47 έως και 56, οι οποίοι παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των συσχετίσεων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN με τα δημογραφικά στοιχεία (κάπνισμα, εγχύσεις, υποτροπές, φύλο, έκθεση και ηλικία), ωστόσο δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p\text{-value} > 0.05$).

pTEN (επιφανειακό)	Κάπνισμα			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	3	3	6	
	50.0%	50.0%		
Ασθενής	5	4	9	Fisher's exact p-value= 0.90
	57.1%	42.9%		
Μέτρια	1	4	5	
	25.0%	75.0%		
Έντονη	8	9	17	
	46.2%	53.8%		
Σύνολο	17	20	37	
	46.4	53.6		
	%	%		

Πίνακας 47. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

pTEN (διηθητικό)	Κάπνισμα			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	14 44.0%	18 56.0%	32	Fisher's exact p-value= 0.26
Ασθενής	1 100.0%	0 0%	1	
Μέτρια	0 0%	3 100.0%	3	
Έντονη	1 100.0%	0 0%	1	
Σύνολο	16 44.8%	21 55.2%	37	

Πίνακας 48. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (διηθητικό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

pTEN (επιφανειακό)	Εγχύσεις			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	5 100.0%	0 0%	5	Fisher's exact p-value= 0.17
Ασθενής	4 42.9%	5 57.1%	9	
Μέτρια	4 75.0%	1 25.0%	5	
Έντονη	7 38.5%	10 61.5%	17	
Σύνολο	20	17	37	

53.6% 46.4
%

Πίνακας 49. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με τις εγχύσεις.

pTEN (διηθητικό)	Εγχύσεις			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	17 52.0%	16 48.0%	33	
Ασθενής	0 0%	1 100.0%	1	Fisher's exact p-value> 0.999
Μέτρια	1 50.0%	1 50.0%	2	
Έντονη	0 0%	1 100.0%	1	
Σύνολο	18 48.3 %	20 51.7%	38	

Πίνακας 50. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (διηθητικό) με τις εγχύσεις.

pTEN (επιφανειακό)	Υποτροπές			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	5 100.0%	0 0%	5	
Ασθενής	4 42.9%	5 57.1%	9	Fisher's exact p-value= 0.25
Μέτρια	3 50.0%	3 50.0%	6	
Έντονη	7	10	17	

	38.5%	61.5%	
	18	18	36
Σύνολο	50.0%	50.0%	

Πίνακας 51. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με τις υποτροπές.

pTEN (διηθητικό)	Υποτροπές			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	16 48.0%	17 52.0%	33	
Ασθενής	0 0%	1 100.0%	1	Fisher's exact p-value> 0.999
Μέτρια	1 50.0%	1 50.0%	2	
Έντονη	0 0%	1 100.0%	1	
Σύνολο	17 44.8%	21 55.2%	38	

Πίνακας 52. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (διηθητικό) με τις υποτροπές.

pTEN (επιφανειακό)	Φύλο		Σύνολο	
	Άντρας	Γυναίκα		
Αρνητική	7 100.0%	0 0%	7	Fisher's exact p-value=0.77
Ασθενής	10 100.0%	0 0%	10	

Μέτρια	7	0	7
	100.0%	0%	
Έντονη	16	3	19
	85.7%	14.3%	
Σύνολο	39	3	42
	93.8%	6.3%	

Πίνακας 53. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με το φύλο.

pTEN (διηθητικό)	Φύλο			Fisher's exact p-value>0.999
	Άντρας	Γυναίκα	Σύνολο	
Αρνητική	35	3	38	
	93.1%	6.9%		
Ασθενής	1	0	1	
	100.0%	0%		
Μέτρια	3	0	3	
	100.0%	0%		
Έντονη	3	0	3	
	100.0%	0%		
Σύνολο	42	3	45	
	94.1%	5.9%		

Πίνακας 54. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (διηθητικό) με το φύλο.

pTEN (επιφανειακό)	Έκθεση			Fisher's exact p-value>0.999
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	5	0	5	
	100.0%	0%		
Ασθενής	8	1	9	

	85.7%	14.3%	
Μέτρια	5	0	5
	100.0%	0%	
Έντονη	13	3	16
	83.3%	16.7%	
Σύνολο	31	4	35
	88.9%	11.1%	

Πίνακας 55. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με την έκθεση.

pTEN (διηθητικό)	Έκθεση			Fisher's exact p-value=0.21
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Αρνητική	29	3	32	
	91.7%	8.3%		
Ασθενής	1	0	1	
	100.0%	0%		
Μέτρια	3	0	3	
	100.0%	0%		
Έντονη	0	1	1	
	0%	100.0%		
Σύνολο	33	4	37	
	89.3%	10.7%		

Πίνακας 56. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με την έκθεση.

pTEN (επιφανειακό)	N	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη Τιμή	Μέγιστη Τιμή	ANOVA test (p-value)
Αρνητική	7	68.4	7.54	60	76	0.13 (0.94)

Ασθενής	10	69.8	14.36	51	92
Μέτρια	7	70.0	9.93	53	78
Έντονη	17	71.9	10.90	56	87
Σύνολο	41	70.5	10.87	51	92

Πίνακας 57. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (επιφανειακό) με την ηλικία (σε έτη).

pTEN (διηθητικό)	N	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη Τιμή	Μέγιστη Τιμή	ANOVA test (p-value)
Αρνητική	38	70.1	11.47	51	92	
Ασθενής	1	65.0	-	65	65	
Μέτρια	3	71.5	0.71	71	72	0.08 (0.97)
Έντονη	1	70.0	-	70	70	
Σύνολο	43	70.0	10.77	51	92	

Πίνακας 58. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (διηθητικό) με την ηλικία (σε έτη).

Παρακάτω, γίνεται σύγκριση ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου και τα δημογραφικά στοιχεία. Από τον Πίνακα 68 και 69 παρατηρούμε πως η ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο δεν συσχετίζονται σημαντικά (p-value>0.05).

pTEN	Βαθμός διαφοροποίησης				Fisher's exact P-value=0.481
	Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	G1	G2	G3	
Δεν εκφράζεται		0	0	0	0
		0%	0%	0%	
Κυτταροπλασματική		4	14	21	39
		10.0%	36.7%	53.3%	
Πυρηνική		0	1	10	11
		0%	11.1%	88.9%	
Μικτή		2	14	27	43
		5.9%	32.4%	61.8%	
Σύνολο		6	29	58	93

6.8% 31.5% 61.6%

Πίνακας 59. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης.

pTEN	Στάδιο			
	T1	T2	Σύνολο	
Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση				
Δεν εκφράζεται	0 0%	0 0%	0	
	20	20	40	
Κυτταροπλασματική	50.0%	50.0%		Fisher's exact p-value=0.193
	3	9	12	
Πυρηνική	22.2%	77.8%		
	26	20	46	
Μικτή	57.1%	42.9%		
	49	49	98	
Σύνολο	50.0 %	50.0 %	100.0 %	

Πίνακας 60. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN με το στάδιο.

Στη συνέχεια, οι Πίνακες 61 έως και 70 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των συσχετίσεων της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN με τα δημογραφικά στοιχεία (κάπνισμα, εγχύσεις, υποτροπές, φύλο, έκθεση και ηλικία), ωστόσο δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p\text{-value} > 0.05$).

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Κάπνισμα			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0 0%	0 0%	0	Fisher's exact p-value= 0.853
	10	8	18	

Κυτταροπλασματική	57.1%	42.9%	
	0	1	1
Πυρηνική	0%	100.0%	
	12	10	22
Μικτή	52.9%	47.1%	
	22	19	41
Σύνολο	53.1%	46.9%	

Πίνακας 61. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (επιφανειακό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Εγγύσεις			Fisher's exact p-value= 0.373
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0	0	0	
	0%	0%		
	7	12	19	
Κυτταροπλασματική	35.7%	64.3%		
	1	0	1	
Πυρηνική	100.0%	0%		
	12	10	22	
Μικτή	52.9%	47.1%		
	19	22	41	
Σύνολο	46.9%	53.1%		

Πίνακας 62. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (επιφανειακό) με τις εγγύσεις.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Υποτροπές			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0 0%	0 0%	0	
Κυτταροπλασματική	5 28.6%	13 71.4%	18	Fisher's exact p-value= 0.204
Πυρηνική	1 100.0%	0 0%	1	
Μικτή	12 52.9%	10 47.1%	22	
Σύνολο	18 43.8%	23 56.3%	41	

Πίνακας 63. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (επιφανειακό) με τις υποτροπές.

.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Φύλο		Σύνολο	
	Άντρας	Γυναίκα		
Δεν εκφράζεται	0 0%	0 0%	0	
Κυτταροπλασματική	22 100.0%	0 0%	22	Fisher's exact p-value= 0.518
Πυρηνική	1 100.0%	0 0%	1	
Μικτή	25 90.5%	3 9.5%	28	
Σύνολο	50 94.9%	3 5.1%	53	

Πίνακας 64. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (επιφανειακό) με το φύλο

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Έκθεση			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0	0	0	Fisher's exact p-value= 0.302
	0%	0%		
Κυτταροπλασματική	18	0	18	
	100.0%	0%		
Πυρηνική	1	0	1	
	100.0%	0%		
Μικτή	17	4	21	
	81.3%	18.8%		
Σύνολο	36	4	40	
	90.3%	9.7%		

Πίνακας 65. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (επιφανειακό) με την έκθεση.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Κάπνισμα			
	Όχι	Ναι	Σύνολο	
Δεν εκφράζεται	0	0	0	Fisher's exact p-value= 0.20
	0%	0%		
Κυτταροπλασματική	0	1	1	
	0%	100.0%		
Πυρηνική	3	0	3	
	100.0%	0%		
	0	3	3	

Μικτή	0%	100.0%	
Σύνολο	3	4	7
	40.0%	60.0%	

Πίνακας 66. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (διηθητικό) με τις καπνιστικές συνήθειες.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Εγγύσεις		Σύνολο	Fisher's exact p-value= 0.60
	Όχι	Ναι		
Δεν εκφράζεται	0	0	0	
	0%	0%		
Κυτταροπλασματική	1	0	1	
	100.0%	0%		
Πυρηνική	0	3	3	
	0%	100.0%		
Μικτή	1	1	2	
	50.0%	50.0%		
Σύνολο	3	4	7	
	40.0%	60.0%		

Πίνακας 67. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (διηθητικό) με τις εγγύσεις.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Υποτροπές		Σύνολο	Fisher's exact p-value= 0.20
	Όχι	Ναι		
Δεν εκφράζεται	0	0	0	
	0%	0%		
Κυτταροπλασματική	1	0	1	
	100.0%	0%		
	0	3	3	

Πυρηνική	0%	100.0%	
	0	3	3
Μικτή	0%	100.0%	
	1	6	7
Σύνολο	20.0%	80.0%	

Πίνακας 68. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (διηθητικό) με τις υποτροπές.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Φύλο		Σύνολο
	Άντρας	Γυναίκα	
Δεν εκφράζεται	0	0	0
	0%	0%	
	1	0	1
Κυτταροπλασματική	100.0%	0%	
	3	0	3
Πυρηνική	100.0%	0%	
	4	0	4
Μικτή	100.0%	0%	
Σύνολο	8	0	8
	100.0%	0%	

Πίνακας 69. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (διηθητικό) με το φύλο.

Ανοσοϊστοχημική Εντόπιση	Έκθεση		Σύνολο
	Όχι	Ναι	
Δεν εκφράζεται	0	0	0
			Fisher's exact

	0%	0%		p-value > 0.999
	1	0	1	
Κυτταροπλασματική	100.0%	0%		
	1	1	2	
Πυρηνική	50.0%	50.0%		
	3	0	3	
Μικτή	100.0%	0%		
Σύνολο	5	1	6	
	80.0%	20.0%		

Πίνακας 70. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN (διηθητικό) με την έκθεση.

8.Αποτελέσματα σύγκρισης της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PAKT με το PTEN

Όσο αφορά στη συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης pAKT και ανοσοϊστοχημικής εντόπισης στο pTEN στο επιφανειακό παρατηρούμε πως δεν υπάρχει ασθενής και μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT στην πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση που εξετάζουμε το διηθητικό (Πίνακες 71 και 72 αντίστοιχα).

pAKT	Ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN				
	Κυτταροπλασματική έκφραση	Πυρηνική	Μικτή	Σύνολο	
Αρνητική	0	0	0	0	
	0%	0%	0%		
Ασθενής	8	0	7	15	
	54.5%	0%	45.5%		Fisher's exact p-value=0.66
Μέτρια	3	0	8	11	
	25.0%	0%	75.0%		
Έντονη	12	1	13	25	
	45.0%	5.0%	50.0%		
Σύνολο	23	1	28	51	

43.6% 2.6% 53.8%

Πίνακας 71 Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pTEN (επιφανειακό).

pAKT Ανοσοϊστοχημική έκφραση	Ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN				Fisher's exact p- value=0.70
	Κυτταροπλασματι κή	Πυρηνικ ή	Μικτή	Σύνολο	
Αρνητική	0 0%	1 100.0%	0 0%	1	
Ασθενής	1 33.3%	0 0%	3 66.7%	4	
Μέτρια	0 0%	0 %	1 100.0%	1	
Έντονη	0 0%	1 100.0%	0 0%	1	
Σύνολο	1 16.7%	3 33.3%	4 50.0%	8	

Πίνακας 72. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pTEN (διηθητικό).

Από τον Πίνακα 73 παρατηρούμε πως το 71.4% των περιπτώσεων με έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση στο pTEN επιφανειακό έχουν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση στο pAKT. Από τον έλεγχο φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ ανοσοϊστοχημικής έκφρασης pTEN και ανοσοϊστοχημικής εντόπισης pAKT (p-value=0.001). Στον Πίνακα 33 φαίνονται τα αποτελέσματα για το διηθητικό.

pTEN Ανοσοϊστοχημική έκφραση	Ανοσοϊστοχημική εντόπιση pAKT					Fisher's exact p-value=0.001
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική	Πυρηνική	Μικτή	Σύνολο	
Αρνητική	7 100.0%	0 0%	0 0%	0 0%	7	
Ασθενής	0 0%	4 37.5%	1 12.5%	5 50.0%	10	
Μέτρια	0	1	1	4	6	

	0%	20.0%	20.0%	60.0%	
Έντονη	0	4	1	13	18
	0%	21.4%	7.1%	71.4%	
Σύνολο	7	9	3	22	41
	15.6%	21.9%	9.4%	53.1%	

Πίνακας 73. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pAKT (επιφανειακό).

pTEN	Ανοσοϊστοχημική εντόπιση pAKT				
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική	Πυρηνική	Μικτή	Σύνολο
Αρνητική	1 100.0%	0 0%	0 0%	0 0%	1
Ασθενής	0 0%	0 0%	0 0%	1 100.0%	1
Μέτρια	0 0%	0 0%	0 0%	3 100.0%	3
Έντονη	0 0%	1 50.0%	0 0%	1 50.0%	2
Σύνολο	1 16.7%	1 16.7%	0 0%	5 66.7%	7

Fisher's exact p-value=0.73

Πίνακας 74. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση για το pAKT (διηθητικό).

9. Αποτελέσματα από τη σύγκριση για την mRNA έκφραση του p85, p110 και pTEN με την ανοσοϊστοχημική έκφραση και εντόπιση του pAKT και pTEN

Προκειμένου να γίνει σύγκριση των δεικτών p85, p110 και pTEN με την ανοσοϊστοχημική έκφραση και εντόπιση των pAKT και pTEN έγινε κατηγοριοποίηση της mRNA έκφρασης σε δύο ομάδες αφού υπολογίστηκε η διάμεση τιμή των φυσιολογικών δειγμάτων για κάθε δείκτη και χρησιμοποιήθηκε για την

κατηγοριοποίηση. Όσες παρατηρήσεις είχαν τιμή χαμηλότερη ή ίση από το 50% της διάμεσης τιμής των φυσιολογικών θεωρήθηκε ως η χαμηλά εκφραζόμενη κατηγορία και όσες είχαν τιμή υψηλότερη από το 50% της διάμεσης τιμής των φυσιολογικών θεωρήθηκε ως υψηλά εκφραζόμενη κατηγορία. Οι Πίνακες 75 έως και 86 που ακολουθούν απεικονίζουν τη συσχέτιση της mRNA έκφρασης με την ανοσοϊστοχημική έκφραση και εντόπιση. Αυτό που παρατηρούμε είναι πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση της mRNA έκφρασης p85 με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT (p-value= 0.034 < 0.05) και οριακά σημαντική συσχέτιση της mRNA έκφρασης p110 με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN (p-value= 0.062 < 0.10). Ειδικότερα, παρατηρούμε πως στη χαμηλή εκφραζόμενη κατηγορία του p85 η πλειοψηφία των παρατηρήσεων έχουν μέτρια και έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT. Επιπλέον, στη χαμηλή εκφραζόμενη κατηγορία του p110 η πλειοψηφία των παρατηρήσεων έχουν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση στο pTEN.

P85	pAKT				Σύνολο ο	Fisher's exact p-value= 0.034
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη		
Χαμηλή έκφραση	7 17.5%	8 20.0%	12 30.0%	13 32.5%	40	
Υψηλή έκφραση	1 5.6%	8 44.4%	0 0%	9 50.0%	18	
Σύνολο	8 (13.8%)	16 (27.6%)	12 (20.7%)	22 (37.9%)	58	

Πίνακας 75. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p85 με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT

P85	pAKT				Σύνολο	Fisher's exact p-value= 0.758
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική	Πυρηνική	Μικτ ή		
Χαμηλή έκφραση	0 0%	12 60.0%	3 100.0%	17 66.7%	32	
Υψηλή έκφραση	0 0%	8 40.0%	0 0%	9 33.3%	17	

	0	20	3	26	49
Σύνολο					

Πίνακας 76. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p85 με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pAKT

P110	pAKT				Σύνολο	
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη		
Χαμηλή έκφραση	0 0%	10 66.7%	12 100.0%	17 82.4%	39 81.6%	Fisher's exact p-value= 0.198
Υψηλή έκφραση	0 0%	5 33.3%	0 0%	4 17.6%	9 18.4%	
Σύνολο	0	15	12	21	48	

Πίνακας 77. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p110 με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT

P110	pAKT				Σύνολο	
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική	Πυρηνική	Μικτή		
Χαμηλή έκφραση	0 0%	17 86.7%	3 100.0%	21 76.2%	41 81.6%	Fisher's exact p-value= 0.784
Υψηλή έκφραση	0 0%	3 13.3%	0 0%	7 23.8%	10 18.4%	
Σύνολο	0	20	3	28	51	

Πίνακας 78. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p110 με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pAKT

pTEN	pAKT				Σύνολο	
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη		
Χαμηλή έκφραση	0 0%	14 91.7%	10 88.9%	21 94.1%	45 92.1%	
Υψηλή έκφραση	0 0%	1 8.3%	1 11.1%	1 5.9%	3 7.9%	Fisher's exact p-value > 0.999
Σύνολο	0	15	11	22	48	

Πίνακας 79. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του pTEN με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT

pTEN	pAKT				Σύνολο	
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική	Πυρηνική	Μικτή		
Χαμηλή έκφραση	0 0%	17 86.7%	3 100.0%	25 95.2%	45 92.1%	
Υψηλή έκφραση	0 0%	3 13.3%	0 0%	1 4.8%	4 7.9%	Fisher's exact p-value = 0.627
Σύνολο	0	20	3	26	49	

Πίνακας 80. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του pTEN με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pAKT

P85	pTEN				Σύνολο
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη	

Χαμηλή έκφραση	7 83.3%	5 50.0%	1 50.0%	16 70.6%	29 66.7%	Fisher's exact p-value= 0.841
Υψηλή έκφραση	1 16.7%	5 50.0%	1 50.0%	7 29.4%	14 33.3%	
Σύνολο	8	10	2	23	43	

Πίνακας 81. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p85 με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pTEN

P85	pTEN					Σύνολο	
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική	Πυρηνική	Μικτή	Μικτή		
Χαμηλή έκφραση	7 83.3%	5 50.0%	1 50.0%	16 70.6%	29 67.4%	Fisher's exact p-value= 0.518	
Υψηλή έκφραση	1 16.7%	5 50.0%	1 50.0%	7 29.4%	14 32.6%		
Σύνολο	8	10	2	23	43		

Πίνακας 82. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p85 με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN

P110	pTEN				Σύνολο	
	Αρνητική	Ασθενής	Μέτρια	Έντονη		
Χαμηλή έκφραση	4 50.0%	9 87.5%	5 80.0%	17 92.9%	36 81.8%	Fisher's exact p-value= 0.134
Υψηλή	4	1	1	1	7	

έκφραση	50.0%	12.5%	20.0%	7.1%	18.2%
Σύνολο	8	10	7	18	43

Πίνακας 83. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p110 με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pTEN

P110	pTEN		Μικτ ή	Σύνολο	Fisher's exact p-value= 0.062
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική Πυρηνική			
Χαμηλή έκφραση	4 50.0%	8 85.7%	3 66.7%	21 94.1%	36 81.8%
Υψηλή έκφραση	4 50.0%	1 14.3%	1 33.3%	1 5.9%	7 18.2%
Σύνολο	8	9	4	22	43

Πίνακας 84. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του p110 με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN

pTEN	pTEN			Σύνολο	Fisher's exact p-value= 0.867
	Αρνητική	Ασθενής	Έντον η Μέτρια		
Χαμηλή έκφραση	7 83.3%	9 87.5%	7 100.0%	17 92.9%	40 90.9%
Υψηλή έκφραση	1 16.7%	1 12.5%	0 0%	1 7.1%	3 9.1%
Σύνολο	8	10	7	18	43

Πίνακας 85. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του pTEN με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pTEN

pTEN	pTEN				Σύνολο	Fisher's exact p-value= 0.676
	Δεν εκφράζεται	Κυτταροπλασματική	Πυρηνική	Μικτ ή		
Χαμηλή έκφραση	7 83.3%	8 85.7%	4 100.0%	21 94.1%	40 90.9%	
Υψηλή έκφραση	1 16.7%	1 14.3%	0 0%	1 5.9%	3 9.1%	
Σύνολο	8	9	4	22	43	

Πίνακας 86. Συσχέτιση της mRNA έκφρασης του pTEN με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN

10. Δείγματα με μικτή ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και ταυτοχρόνως υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT και συσχέτισή τους με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου

Η συσχέτιση των δειγμάτων με μικτή ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και ταυτοχρόνως υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο έδειξε τα ακόλουθα: το 13% των δειγμάτων είχε βαθμό διαφοροποίησης G1, το 40% είχε βαθμό διαφοροποίησης G2 και το 47% είχε βαθμό διαφοροποίησης G3.

Όσο αφορά στο στάδιο, το 80% των δειγμάτων είχε στάδιο T1 και το 20% στάδιο T2. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των δειγμάτων με πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT ήταν 100% (1) με βαθμό διαφοροποίησης G2 και 100% με στάδιο T1.

Σε όσα δείγματα είχαν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT, το 17% είχε βαθμό διαφοροποίησης G1, το 33% βαθμό διαφοροποίησης G2 και το 50% βαθμό διαφοροποίησης G3. Όσο αφορά στο στάδιο, το 75% είχε στάδιο T1 και το υπόλοιπο 25% (4) στάδιο T2.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διατριβή αυτή αφορά στη μελέτη δεικτών οι οποίοι είναι πιθανό να παίζουν κάποιο ρόλο στην κακοήθεια και πιο συγκεκριμένα στον καρκίνο της κύστης.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αντιπροσωπεύει την ενάτη συνηθέστερη αιτία καρκίνου στην παγκόσμια κοινότητα κατά το 2000, και υπολογίζεται ότι 336000 νέες περιπτώσεις καρκίνου της ουροδόχου κύστεως το χρόνο εμφανίζονται παγκοσμίως, αντιπροσωπεύοντας το 3,3% των νέων περιπτώσεων καρκίνου ανά έτος. Η θνητότητα είναι σε απόλυτο παραγοντικό αριθμό 6,55 για τους άνδρες και 1,21 για τις γυναίκες, δηλαδή πενταπλάσια για τους άνδρες (Hemmelt et.al, 2009). Η Ελλάδα κατέχει υψηλή θέση μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης με 16 νέες περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού ανά έτος σύμφωνα με τα στοιχεία από το EAUCAN (European Union CANcer incidence, mortality and prevalence) EAUCAN 1998.Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union.(EAUCAN , 1998)-[Http://www-dept.iarc.fr/eucan/eucan.htm](http://www-dept.iarc.fr/eucan/eucan.htm). Η αναλογία στη χώρα μας μεταξύ ανδρών / γυναικών είναι της τάξης του 4,6/1, ενώ η νόσος συναντάται σε μεγαλύτερη συχνότητα στους κατοίκους των αστικών περιοχών. Επιπλέον η θνησιμότητα από καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχει διπλασιαστεί στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών.

Η μοριακή βιολογία του καρκίνου της κύστης όπως ακριβώς και σε άλλους τύπους καρκίνου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο όσο αφορά στην ανάπτυξη του καρκίνου καθώς καταφέρνει με πειστικό τρόπο τις περισσότερες φορές να υποδείξει τα βιολογικά μόρια εκείνα, είτε αυτά είναι πρωτεΐνες, είτε είναι ανάδειξη γονιδίων με συγκεκριμένες ενδείξεις έκφρασης σε επίπεδο γενετικού υλικού, τα οποία είναι δυνατό να παίζουν σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη του φαινομένου ή στην καταπολέμηση του και αντιμετώπισή του. Τα βιολογικά αυτά μόρια συνδέονται λειτουργικά και αποτελούν μέρη συγκεκριμένων ακολουθιών βιοχημικών φαινομένων που ονομάζονται μονοπάτια. Τα μονοπάτια αυτά είναι δυνατό να αποτελούνται από ελάχιστα μόρια ως και να είναι εξαιρετικά πολύπλοκα και να αποτελούνται από δεκάδες μόρια.

Στην συγκεκριμένη μελέτη η οποία παρουσιάζεται εδώ, το μονοπάτι το οποίο μελετήθηκε στην περίπτωση του καρκίνου της κύστης είναι το μονοπάτι των πρωτεϊνών PI3K/Akt. Το μονοπάτι αυτό έχει περιγραφεί όσο αφορά στην λειτουργία του και την σημασία του σε πολλές ασθένειες και εκτός καρκίνου όπως στην περίπτωση των καρδιακών παθήσεων (Zálešák et.al, 2015) και στην αρτηριοσκλήρυνση (Luo et.al 2015).

Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει σημαντικά μόρια τα οποία περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη PI3K, αλλά και τις πρωτεΐνες Akt και mTOR καθώς και ένα άλλο πλήθος πρωτεϊνών οι οποίες έχουν ως λειτουργία την μεταφορά της πληροφορίας η οποία προέρχεται από μόρια όπως είναι οι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες π.χ. EGF και VEGF και η οποία πληροφορία ή μήνυμα έχει ως αποτέλεσμα για παράδειγμα την αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας και του πληθυσμού των κυττάρων αλλά και άλλων λειτουργιών οι οποίες επάγουν την καρκινογένεση όπως η αγγειογένεση. Κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτού λοιπόν του μονοπατιού αποτελούν και το αντικείμενο έρευνας της μελέτης αυτής.

Το πρώτο αντικείμενο έρευνας στην παρούσα διατριβή αποτελεί η αλληλούχιση του DNA δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης για την πιθανή εύρεση μεταλλάξεων στο γονίδιο αυτό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η μελέτη της αλληλουχίας των 65 ασθενών από τους οποίους ελέγχθηκε το γενετικό υλικό για το γονίδιο της PI3K εμφάνισαν μεταλλάξεις οι οποίες κατά την βιβλιογραφία είναι ικανές να επιφέρουν αλλαγές στην λειτουργία της πρωτεΐνης. Είναι γνωστό ότι πολλές από τις μεταλλάξεις στο μόριο της PI3K επιφέρουν αλλαγές στην έκφραση της PI3K είτε έχει να κάνει με την PI3KCA είτε με την p85 (Iyer et.al, 2013, Juanpere et.al, 2012). Επίσης ανιχνεύθηκε μετάλλαξη η οποία δεν ευρισκόταν στο τμήμα του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, ούτε βρισκόταν στο τμήμα που ορίζει το όριο μεταξύ ιντρονίου-εξωνίου.

Η ύπαρξη της μετάλλαξης αυτής είναι δυνατό να μην έχει σημασία για την λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής καθεαυτής αλλά ενδέχεται για παράδειγμα να παίζει κάποιο άλλο άγνωστο ρόλο. Δεδομένου ότι στο μεγαλύτερο μέρος των περιπτώσεων σε οποιοδήποτε μορφή καρκίνου και ειδικότερα σε ότι αφορά το μονοπάτι PI3K, το τμήμα PI3KCA φέρει αρκετές αλλαγές και ειδικότερα μεταλλάξεις, η ύπαρξη αναλόγων μεταλλάξεων στην παρούσα μελέτη είναι σύμφωνη με την διεθνή βιβλιογραφία και επιβεβαιώνει την ενεργοποίηση και συμμετοχή του εν λόγω σηματοδοτικού μονοπατιού στην παθογένεση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Σε πρόσφατες μελέτες σε άλλους τύπους καρκίνου και ειδικότερα ηπατοκυτταρικού καρκίνου έχει διαπιστωθεί η απουσία τέτοιων μεταλλάξεων από την κωδική περιοχή του γονιδίου και ειδικότερα από τα λεγόμενα hotspots (Tanaka et.al, 2006). Στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι κοντά στο όριο μεταξύ ιντρονίου-εξωνίου, και μετά από αλληλούχιση του DNA της περιοχής αυτής, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει επανάληψη μέρους της αλληλουχίας wild type της PI3KCA ή σε κάποιες περιπτώσεις τελείως διαφορετική αλληλουχία DNA από τις αναμενόμενες. Ειδικότερα βρέθηκε ότι η νέο-προσαρτώμενη αλληλουχία παρουσίαζε μεγάλες ομοιότητες με το λεγόμενο Cat Eye Syndrome και η οποία αλληλουχία εμπεριέχει ένα πολύ συχνά συναντώμενο ψευδογονίδιο του PI3KCA. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς των οποίων το υλικό ελέγχθηκε ήταν όλοι Ιάπωνες. Στην περίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, παρόμοια αποτελέσματα έχουν εκφραστεί και στην μελέτη των Hou et.al όπου σε εκείνη την περίπτωση όλοι οι ασθενείς ήταν Κινέζοι (Hou et.al, 2014).

Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στην εν λόγω εργασία (2 missense, 1 frameshift) στο {c.3140A>G (p.His1047Arg), c.[3172A>T(;3174C>T] (p.Ile1058Phe), c.3203dupA (p.Asn1068Lysfs*5)}, αφορούν το εξόνιο 20 της *PIK3CA*, που είναι γνωστό για την ρυθμιστική του δράση όσον αφορά την λειτουργία του γονιδίου και αποτελεί hot spot για ανεύρεση μεταλλάξεων του εν λόγω γονιδίου. Σε διάφορα είδη ανθρώπινων κακοήθων εξεργασιών έχουν παρατηρηθεί ενεργοποιητικές μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις κινάσες PI3K. Μεταλλαγές των υπομονάδων της PI3K κινάσης εμπλέκονται στην καρκινογένεση των ωθηκών, του μαστού, του στομάχου καθώς και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Lee et al. 2005). Για παράδειγμα, στο 40% των καρκίνων των ωθηκών, παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *PIK3CA* (Shayesteh et al. 1999). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ενίσχυση και υπερ-έκφραση του *PIK3CA* στον καρκίνο των ωθηκών, του μαστού και του στομάχου. Όσον αφορά τις σωματικές μεταλλαγές του *PIK3CA* γονιδίου, αυτές έχουν εντοπιστεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου (25% με 32%), στον καρκίνο του στομάχου (25%), στον καρκίνο του μαστού (3% με 8%), στον καρκίνο του πνεύμονα (4%) και στα γλοιοβλαστώματα (27%) (Samuels and Velculescu 2004). Οι συγκεκριμένες μεταλλαγές έχουν σαν αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση των PI3K κινασών στα κύτταρα.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι όπως και σε άλλες παρόμοιες εργασίες στις οποίες ελέγχθηκε και μελετήθηκε η συμβολή και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-AKT σε διαφόρους ανθρώπινους καρκίνους, βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA*, οι οποίες ενοχοποιούνται για την δυσλειτουργία του γονιδίου και συμμετοχή σε καρκινογεννητικές διαδικασίες, έτσι και στην εν λόγω εργασία επιβαιβώνεται η παρουσία τέτοιων παθολογικών μεταλλάξεων σε hot spot του γονιδίου της *PIK3CA*, οι οποίες εύλογα συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού και στην επαγωγή της καρκινογένεσης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι 2 από τις 3 μεταλλάξεις που βρέθηκαν, παρατηρούνται για πρώτη φορά στον καρκίνο της κύστης και σίγουρα θα αποτελέσουν αντικείμενο περαιτέρω μελέτης.

Γονιδιακή έκφραση-Μεταγραφική δυναμική και παραγωγή mRNA mRNA και περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στην συνέχεια εξετάσαμε τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για πρωτεΐνες του μονοπατιού PI3K/Akt. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ανιχνεύοντας την παραγωγή mRNA και ανάλογα πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση όπως αναφέρθηκε παραπάνω στα αποτελέσματα και στο κομμάτι Υλικά και Μέθοδοι.

Σε ότι αφορά αρχικά την έκφραση των γονιδίων σε επίπεδο mRNA, επιχειρήθηκε η ανίχνευση πιθανών συσχετίσεων με δημογραφικούς παράγοντες αλλά και με τον βαθμό κακοήθειας και το στάδιο της νόσου και το φύλο. Ειδικότερα και όσο αφορά στις πρωτεΐνες οι οποίες ελέγχθηκαν, η έκφραση σε επίπεδο mRNA της υπομονάδας p85 της PI3K με το φύλο παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$), ενώ φαίνεται να έχει και οριακά στατιστικά σημαντική σχέση με το σύστημα σταδιοποίησης του όγκου TNM και με το στάδιο ($p\text{-value} = 0.066$ και $p\text{-value} = 0.06$ $0 < 0.10$ αντίστοιχα).

Σε αυτή την μελέτη που πραγματοποιήσαμε έχει σημασία να αναφέρουμε ότι οι γυναίκες έχουν υψηλότερη διάμεση τιμή p85 (2.75) σε σύγκριση με τους άντρες (0.74), καθώς και πως οι ασθενείς με σταδιοποίηση του όγκου T2 παρουσιάζουν υψηλότερη διάμεση τιμή (0.71) σε σχέση με όσους έχουν στάδιο T1 (0.53). Όσο αφορά στην μεταγραφή του p85, σε μελέτη στον καρκίνο του μαστού οι ενδείξεις έδειξαν ότι η υποέκφραση του p85 σε επίπεδο mRNA παραπέμπει σε περισσότερο επιθετικές μορφές του όγκου και σε μικρότερο χρονικό διάστημα επιβίωσης χωρίς την παρουσία όγκου και την ύπαρξη μετάστασης (Cizkova et.al, 2013). Στον ίδιο τύπο καρκίνου το μέγεθος της έκφρασης του p85, είναι δυνατό να διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους υπότυπους της νόσου. Το τελευταίο ίσως να εφαρμόζεται και στην περίπτωση της δικής μας μελέτης αφού παρατηρείται διαφοροποίηση της μεταγραφής του mRNA του p85 ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου της κύστης που εξετάζουμε.

Για την ίδια περίπτωση υποέκφρασης του p85 σε επίπεδο mRNA, στον καρκίνο του ήπατος έχει επίσης αποδειχθεί η συσχέτιση μεταξύ χαμηλής μεταγραφικής δυναμικής του και περισσότερο επιθετικών μορφών καρκίνου (Kalinsky et.al, 2009, Taniguchi et.al, 2010). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν και την σημασία της πρωτεΐνης αυτής στην επαγωγή ή μη του μονοπατιού PI3K/Akt.

Δεν βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του p85 με τους υπόλοιπους παράγοντες που αφορούν την μελέτη και πιο συγκεκριμένα καπνιστικές συνήθειες, εγχύσεις, υποτροπή, έκθεση, αριθμός υποτροπών και ηλικία. Εδώ προκύπτει ίσως ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα καθώς σε γενικές γραμμές αύξηση της έκφρασης ή του δυναμικού έκφρασης θα περίμενε κάποιος να έχει ως αποτέλεσμα η νόσος την συχνότερη εμφάνιση σε καπνιστές καθώς η εμφάνιση καρκίνου της κύστης αλλά και γενικότερα καρκίνου αναφέρεται συχνότερα σε άτομα τα οποία καπνίζουν (Freedman et.al, 2011, Rink et.al, 2013). Στις συγκεκριμένες μελέτες αναφέρονται επίσης αποτελέσματα τα οποία δείχνουν ένα συσσωρευμένο ρίσκο μεταξύ καπνιστών το οποίο

φαίνεται να είναι χαμηλότερο για άτομα τα οποία δεν καπνίζουν. Αυτό παραπέμπει στο φαινόμενο του dose effect το οποίο παρατηρείται σε αυτή την περίπτωση (Rink et.al, 2013). Παράλληλα γίνεται αναφορά και στο φύλο με τις περισσότερες περιπτώσεις να εμφανίζεται η νόσος και να παρουσιάζει χειρότερη πρόγνωση στους άνδρες.

Επίσης σε άλλες μελέτες φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του καπνίσματος με διαφοροποίηση στην έκφραση μορίων του μονοπατιού PI3K/Akt. Τέτοιο παράδειγμα έχει αναφερθεί στον καρκίνο του πνεύμονα όπου το κάπνισμα φαίνεται να συσχετίζεται με διαφοροποίηση της PI3K πρωτεΐνης σε σχέση με την Pten (Sarris et.al, 2012, Yamada et.al, 2014). Στον καρκίνο της κύστης αυτό εμφανίζεται και με της μορφής της υποέκφρασης του Mena της PTEN και αύξηση τμημάτων της PI3K και Akt (Brait et.al, 2013).

Όσο αφορά στην έκφραση σε επίπεδο mRNA, της πρωτεΐνης p110, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση ουσιαστικά με κανένα παράγοντα περιβαλλοντικό, ενώ η μοναδική παρατήρηση που θα μπορούσε να γίνει εδώ είναι ότι υπάρχει ίσως μια στατιστική σημαντικότητα όχι όμως της τάξης του 95% confidence σε σχέση με την έκθεση ($p < 0.1$). Για το συγκεκριμένο γονίδιο, το αποτέλεσμα αυτό διαφέρει σε σχέση με μελέτες οι οποίες αναφέρουν συσχέτιση του μεταγραφικού δυναμικού του γονιδίου PI3KCA σε ασθενείς με καρκίνο του στόματος και ιδιαίτερα σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο και πιο επιθετικό τύπο καρκίνου (Estilo et.al, 2003).

Για την ίδια περίπτωση γονιδίου και συγκεκριμένα για τον καρκίνο του οισοφάγου, υπάρχουν αποτελέσματα τα οποία συσχετίζουν το υψηλό μεταγραφικό δυναμικό, την έκφραση δηλαδή της p110, με χειρότερη πρόγνωση στις γυναίκες σε αντίθεση με τους άνδρες και άρα εδώ το φύλο ενδέχεται να συσχετίζεται σθεναρά με την υψηλή έκφραση της p110 και την πρόγνωση (Wang et.al, 2014). Θα πρέπει να τονιστεί βεβαίως ότι το γονίδιο της p110 παρουσίαζε μεταλλάξεις, κάτι πολύ σύνηθες και το οποίο όπως προείπαμε οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της p110. Θα μπορούσε κανείς να αναφέρει ότι στην δική μας μελέτη, το γονίδιο PI3KCA δεν εμφανίζει μεταλλάξεις και αυτό επηρεάζει τον βαθμό έκφρασης του γονιδίου και πιθανά και την συσχέτιση με παράγοντες όπως είναι το φύλο.

Ανάλογα αποτελέσματα παίρνουμε και για την πρωτεΐνη pTEN, καθώς δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της έκφρασης σε επίπεδο mRNA και των δημογραφικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή. Τα δεδομένα εδώ είναι δυνατό να είναι επίσης συγκεχυμένα διότι σε άλλες μελέτες όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου παρατηρούμε ότι η έκφραση της pten παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την νεαρή ηλικία των ασθενών αλλά επίσης αρνητικά σχετιζόμενη και με το φύλο, τις γυναίκες (Colakoglu et.al, 2008). Άρα και στον καρκίνο της κύστης είναι βέβαιο ότι απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός μελετών για την ανεύρεση πιθανών τέτοιων συσχετίσεων.

Ανάλυση μεταξύ των τριών παραγόντων p110, p85 και Pten σε επίπεδο mRNA

Στην συνέχεια, αναλύθηκε η πιθανή στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των τριών δεικτών υπό διερεύνηση, δηλαδή των p110, p85, και pten. Οι παράγοντες αυτοί αναλύθηκαν στατιστικά ανά δύο, ανά ζεύγη, και η ανάλυση έδειξε ότι οι δείκτες οι οποίοι εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα ως προς την RNA έκφραση είναι η p110 με την pten ($r = 0.40$, $p < 0.05$). Οι δύο δείκτες εμφανίζουν παράλληλα ισχυρή έκφραση και όχι το αντίθετο, δηλαδή δεν παρατηρούμε αντιστρόφως ανάλογη παραγωγή RNA που ίσως θα περίμενε κανείς δηλώνοντας έτσι ότι το δυναμικό μεταγραφής των γονιδίων στα δείγματα κύστης που μελετήθηκαν για τα δύο αυτά γονίδια είναι αρκετά ισχυρό.

Σε όλες τις μελέτες που έχουν δημοσιευθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου η μεταγραφική δυναμική και έκφραση των δύο αυτών μορίων είναι αντιστρόφως ανάλογη όπως παρατηρείται στις περιπτώσεις του λεμφώματος (Iengar et.al, 2013), αλλά και στις περιπτώσεις συμπαγών όγκων (Chalhoud and Baker, 2009, Tzenaki et.al, 2012). Το ότι στην δική μας μελέτη παρατηρούμε το αντίθετο είναι κάτι που επιδέχεται ίσως περισσότερης έρευνας είτε με την προσθήκη περισσότερων δειγμάτων στην μελέτη μας είτε στην λεπτομερέστερη μοριακή μελέτη αυτών των γονιδίων και την πιθανότητα ύπαρξης μεταλλάξεων στην περίπτωση της pten για παράδειγμα αφού το γονίδιο για την p110 δεν παρουσιάζει μεταλλάξεις. Παράλληλα δεν παρατηρείται στατιστική συσχέτιση μεταξύ των υπολοίπων ζευγών παραγόντων μεταξύ τους.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και στατιστική ανάλυση μεταξύ των τριών παραγόντων μεταξύ τους. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των διαμέσων τιμών μεταγραφικής δυναμικής μεταξύ των 3 δεικτών (p -value < 0.001). Και εδώ η περαιτέρω μελέτη δειγμάτων ίσως ξεκαθαρίσει ακόμη καλύτερα το τοπίο καθώς θα αναδειχθούν ίσως βαθύτερες αιτίες για το αποτέλεσμα αυτό αφού υπεισέρχεται και εδώ η παράλληλου επιπέδου έκφραση μεταξύ p110 και pten που παρατηρήθηκε πως αναφέραμε όταν εξετάστηκαν οι πρωτεΐνες μεταξύ τους ενώ εδώ φαίνεται να υπάρχει μια παράλληλη έκφραση των p85 και p110 και η pten υπολείπεται σε έκφραση το οποίο παραπέμπει και στο αποδεκτό πλαίσιο (Jordan and Iyer, 2015, Tzenaki et.al, 2012).

Όλα τα παραπάνω δεδομένα μας παρουσιάζουν μια συνολική θεώρηση των δυναμικών έκφρασης των γονιδίων που εξετάστηκαν καθώς σε πολλές περιπτώσεις η μετάβαση της γενετικής πληροφορίας σε πρωτεΐνη είναι δυνατό να διαφέρει ανάλογα με το μόριο όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις στον καρκίνο.

Ανάλυση μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για τα τρία μόρια, ξεχωριστά για το καθένα, μεταξύ της μεταγραφικής δυνατότητας που εμφανίζουν τα μόρια αυτά σε καρκινικούς ιστούς και εκείνης που εμφανίζουν σε φυσιολογικούς ιστούς. Εκεί φαίνεται ότι το p85 στους φυσιολογικούς ιστούς εκφράζεται με υψηλότερη διάμεση τιμή σε σχέση με τους καρκινικούς όγκους, ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση που μελετάμε τους δείκτες p110 και pTEN. Αναφερόμενοι σε αριθμούς και ποσοστά πρέπει να δηλώσουμε ότι το ποσοστό των όγκων που εμφανίζουν χαμηλότερες διάμεσες τιμές από τη διάμεση τιμή των αντιστοίχων φυσιολογικών ιστών περιλαμβάνει για το p85 το 78% των καρκινικών όγκων να εμφανίζονται μικρότεροι από τη διάμεση τιμή (0.72) των φυσιολογικών, στο p110 σε ποσοστό 83% των όγκων να είναι μικρότεροι από τη διάμεση τιμή (0.81) των φυσιολογικών ενώ και στο pTEN το 91% των όγκων είναι μικρότεροι από τη διάμεση τιμή (0.75) των φυσιολογικών ιστών.

Επιπρόσθετα και όσο αφορά στην αμιγώς στατιστική ανάλυση των παραπάνω δεδομένων η σύγκριση των διαμέσων τιμών στο p110 και στο pTEN μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών όγκων δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%. Όταν εξετάζουμε τη μέση τιμή μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών, τότε τα αποτελέσματα είναι προς την ίδια κατεύθυνση. Πιο συγκεκριμένα, στο p85 το 63% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.67) των φυσιολογικών, στο p110 το 83% των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.81) των φυσιολογικών, στο pTEN το 91% (56 περιπτώσεις) των όγκων είναι μικρότεροι απ'τη μέση τιμή (0.81) των φυσιολογικών. Η σύγκριση των μέσων τιμών στο p110 και στο pTEN μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών όγκων δίνει επίσης στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% (t -test p -value = 0.036 και p -value < 0.001 αντίστοιχα). Δηλαδή,

υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της μέσης τιμής του p110 και pTEN στο mRNA μεταξύ των φυσιολογικών ιστών και των όγκων και ειδικότερα η μέση τιμή των φυσιολογικών ιστών είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των καρκινικών.

Εδώ θα πρέπει να αναφέρουμε ότι για τις περιπτώσεις των p110 και pten θα πρέπει να αναφέρουμε ότι όσο αφορά την περίπτωση του pten αυτό είναι εν πολλοίς αναμενόμενο. Αυτό συμβαίνει διότι ο κυρίαρχος ρόλος του pten στον έλεγχο του μονοπατιού του PI3K/Akt, είναι να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του PI3K και ειδικότερα την έκφραση της p110. Αυτό είναι κάτι που παρατηρείται σε όλους τους τύπους καρκίνου όπου έχει μελετηθεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (Chalhoud and Baker, 2009, Tzenaki et.al, 2012) και στους συμπαγείς αυτούς όγκους περιλαμβάνεται και η περίπτωση του καρκίνου της κύστης (Castillo-Martin et.al, 2010).

Όσο αφορά βέβαια στην περίπτωση του p110 εδώ παρουσιάζεται ένα παράδοξο γεγονός καθώς η υψηλότερη έκφραση σε φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με τον καρκινικό όγκο δεν είναι κάτι το οποίο παρατηρούμε στην διεθνή βιβλιογραφία, ίσως θα λέγαμε ότι παρατηρούμε το αντίθετο. Σε αυτή την περίπτωση είναι πιθανό αυτό το φαινόμενο να ξεκαθαριστεί με ανάλυση της έκφρασης του p110 σε περισσότερα δείγματα.

Ανάλυση μεταξύ καρκινικών ιστών ασθενών και καρκινικών σειρών και μεταξύ φυσιολογικών ιστών και καρκινικών σειρών -Σύγκριση με την σειρά RT4

Στην συνέχεια αναλύθηκε η σχέση μεταξύ της μεταγραφικής ικανότητας του mRNA και για τους τρεις αυτούς δείκτες, με σύγκριση μεταξύ καρκινικών ιστών και κυτταρικών καρκινικών σειρών σχετιζόμενες πάντα με τον καρκίνο της κύστης.

Στα αποτελέσματά μας παρουσιάζεται αρχικά η σχέση της έκφρασης των p85, p110 και pTEN μεταξύ καρκινικών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν και των αντίστοιχων τιμών σε καρκινικούς ιστούς. Όσο αφορά την σύγκριση καρκινικών ιστών με την καρκινική σειρά RT4, για το p85 προκύπτει ότι το 83% (49 περιπτώσεις) των τιμών έκφρασης των όγκων είναι μικρότερες από την τιμή του RT4 (1.08). Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p=0.003<0.05$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής του mRNA του p85 στους όγκους σε σχέση με την τιμή μεταγραφής του mRNA στην σειρά RT4.

Για το p110 προκύπτει ότι το 96% (59 περιπτώσεις) των όγκων η τιμή του mRNA είναι μικρότεροι από την αντίστοιχη τιμή του RT4 (1.33). Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό ($p<0.001$) και αυτό πρακτικά σημαίνει ότι υπάρχει σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής του mRNA του p110 στους όγκους σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του RT4. Όσο αφορά στο pTEN το 91% (56 περιπτώσεις) των όγκων είναι μικρότεροι από την τιμή του RT4 (0.76). Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p<0.001$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής του pTEN στους όγκους σε σχέση με την τιμή του RT4.

Και για τις δύο παραπάνω περιπτώσεις αναφερόμενοι στο p85 και στο p110, δεν είναι δυνατό να εξαχθεί συγκεκριμένη απάντηση όσο αφορά στην διαφορά στο μεταγραφικό επίπεδο που παρουσιάζεται ανάμεσα στην κυτταρική σειρά RT4 και στους ιστούς. Είναι βέβαιο ότι οι καρκινικές σειρές είναι περισσότερο ανθεκτικές σε βάθος χρόνου και ίσως να υπάρχει αυτή η δυνατότητα για μεγαλύτερη ικανότητα μεταγραφής σε σχέση με τον όγκο ειδικά στις πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας των σειρών.

Βέβαια στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί αυτή η πιθανή αναντιστοιχία σε επίπεδο μεταγραφής μεταξύ κυτταρικών σειρών και ιστών ή γενικότερα πρωτογενούς βιολογικού υλικού ασθενών. Πιο συγκεκριμένα συστηματικές αναλύσεις των δυναμικών έκφρασης σε κυτταρικές σειρές αλλά και σε βιολογικό υλικό

συμπεριλαμβανομένων ιστών έχει αναδείξει τέτοιες διαφορές στην έκφραση (Lukk et.al, 2010) με τις κυτταρικές σειρές να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερο δυναμικό μεταγραφής σε σχέση με το πρωτογενές βιολογικό υλικό ασθενών. Ίσως να προκαλεί περιέργεια το γεγονός ότι η κυτταρική σειρά RT4 είναι grade 1 και θα περίμενε κανείς διαφορετικό αποτέλεσμα αλλά τελικά η σύγκριση κυτταρικών σειρών με υλικό ασθενών να μην αποδίδει την πραγματική εικόνα διαφοροποίησης της δυνατότητας έκφρασης των γονιδίων. Και στην περίπτωση όμως του Pten είναι δυνατό να συμβαίνει κάτι ανάλογο όσο αφορά την μεταγραφική δυναμική του γονιδίου στους ιστούς σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές.

Επιπλέον, προκύπτει για το p85, ότι το 90% (12 περιπτώσεις) των φυσιολογικών ιστών είναι μικρότεροι από την τιμή του στην σειρά RT4 (1.08). Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p=0.015<0.05$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής του p85 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4. Για το p110 το 100% (13 περιπτώσεις) των φυσιολογικών ιστών είναι μικρότεροι όσο αφορά την αντίστοιχη τιμή από την τιμή του RT4 (1.33) και προκύπτει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p<0.001$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της έκφρασης p110 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του RT4. Τέλος για το pTEN το 50% (7 περιπτώσεις) των φυσιολογικών ιστών εμφανίζουν μικρότερη μεταγραφική τιμή από την τιμή του RT4 (0.76). Ωστόσο, δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης της pTEN στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του RT4 ($p>0.05$).

Εδώ το αποτέλεσμα αυτό εξηγείται καλώς διότι θα περίμενε κανείς ότι το μονοπάτι του PI3K και ειδικότερα οι πρωτεΐνες που το αποτελούν να υπερεκφράζονται στον καρκίνο σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Αυτό είναι κάτι που αναφέρεται κατά κόρον στην βιβλιογραφία όπως έχουμε ήδη δει.

-Σύγκριση με την σειρά T24

Στην συνέχεια αναλύσαμε την συσχέτιση έκφρασης της κυτταρικής σειράς T24 με τα μόρια p85, p110 και pTEN. Πιο συγκεκριμένα, για το p85 φαίνεται πως το 65% (39 περιπτώσεις) των όγκων είναι μικρότεροι από την αντίστοιχη τιμή του T24 (0.71). Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p=0.039<0.05$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής της p85 στους όγκους σε σχέση με την τιμή του T24. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρούμε και για το p110, το 94% (57 περιπτώσεις) των όγκων είναι μικρότεροι από την τιμή του T24 (1.12). Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό ($p\text{-value}< 0.001$), και αυτό σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής της p110 στους όγκους σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή της T24. Όσο αφορά στο pTEN το 23% (14 περιπτώσεις) των όγκων είναι μικρότεροι από την τιμή του T24 = (0.21). Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p<0.001$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής της pTEN στους όγκους σε σχέση με την τιμή του T24.

Για τις περιπτώσεις αυτές τα παραπάνω αποτελέσματα και πάλι θα πρέπει να αναζητηθούν όσο αφορά στην αιτία τους στην διαφορετικότητα της έκφρασης που παρουσιάζονται ενίοτε μεταξύ κυτταρικών σειρών και βιολογικού υλικού ασθενών. Δηλαδή οι κυτταρικές σειρές σίγουρα αποτελούν εξαιρετικό υλικό για την ανίχνευση μηχανισμών και έκφρασης αλλά πολλές φορές η συμπεριφορά τους διαφέρει από το πρωτογενές βιολογικό υλικό που έχει υποστεί τις πιέσεις του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος.

Στη συνέχεια, για το p85 είδαμε ότι το 50% των φυσιολογικών ιστών είναι μικρότεροι από την τιμή του T24 (0.71). Το αποτέλεσμα ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντικό

($p > 0.05$), δηλαδή δεν προκύπτει σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής της p85 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στην T24. Για το p110 το 80% των φυσιολογικών ιστών είναι μικρότεροι από την τιμή της T24 (1.12), και βέβαια προκύπτει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p = 0.01 < 0.05$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής της p110 στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24. Τέλος για το pTEN το 0% των φυσιολογικών ιστών είναι μικρότεροι από την τιμή του T24 = 0.21 και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p < 0.001$), δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής της μεταγραφής της pTEN στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την τιμή του T24.

Το σχόλιο το οποίο θα γίνει και εδώ έχει να κάνει με το ότι στον καρκίνο ολόκληρο το μονοπάτι της PIK/Akt φαίνεται να ενεργοποιείται περισσότερο σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό και αυτό και πάλι είναι κάτι αναμενόμενο αφού υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης του μονοπατιού σε φυσιολογικά κύτταρα από παράγοντες οι οποίοι παίζουν αυτόν ακριβώς τον ρόλο (Knowles et.al, 2009).

Ανοσοϊστοχημική εντόπιση

Ανοσοϊστοχημική εντόπιση και ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PAKT

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική εντόπιση και ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο akt. Από τα αποτελέσματά μας παρατηρούμε ότι το 60% των περιπτώσεων με, θα λέγαμε, μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση, δηλαδή σε περισσότερες από μια περιοχές στο κύτταρο έχουν έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση και το 50% των περιπτώσεων με κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική εντόπιση έχουν ασθενή ανοσοϊστοχημική έκφραση. Από τον έλεγχο φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση $p < 0.001$. Το παραπάνω αποτέλεσμα ισχύει για την περίπτωση του επιφανειακού καρκίνου της κύστης.

Στην περίπτωση που εξετάζουμε τον διηθητικό καρκίνο της κύστης, υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ποσοτικής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT ($p = 0.002 < 0.05$). Ιδιαίτερα, φαίνεται ότι η πλειοψηφία των διηθητικών όγκων έχουν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση με ασθενή και μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση.

Όσο αφορά αυτά τα αποτελέσματα θα πρέπει να υποθέσουμε ότι πιθανότατα τα πειράματά μας εντοπίζουν παραπάνω από ένα ισόμορφα του AKT. Όπως φαίνεται σε μελέτες το ισόμορφο AKT-1 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και λιγότερο στον πυρήνα, ενώ το ισόμορφο AKT-3 εντοπίζεται περισσότερο στον πυρήνα (Feo-Jones et.al, 2005, Santi and Lee, 2010). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και το γεγονός ότι σε πειράματα σε κυτταρικές σειρές οι οποίες δεν ήταν καρκινικές φαίνεται να εντοπίστηκαν όλα τα ισόμορφα στον πυρήνα (Santi and Lee, 2010). Το αν κάποιοι τέτοιοι μηχανισμοί τελικά είναι παρόντες και στην περίπτωση των δικών μας κυττάρων ίσως μελετηθούν στο μέλλον. Αυτό όμως το οποίο γενικά υποστηρίζεται είναι ότι μεγαλύτερη έκφραση του AKT στον πυρήνα είναι γεγονός περισσότερο συσχετιζόμενο με κακή πρόγνωση για τον ασθενή (Santi and Lee, 2010, Prodromidis et.al, 2013).

Στην περίπτωση επίσης που παρατηρούμε μικτή ένταση του φθορισμού ίσως έχει να κάνει και με το ότι η δημιουργία αλλά και καταστροφή των πρωτεϊνών αποτελεί μια διαρκή δυναμική διαδικασία στο κύτταρο αλλά και στο ότι υπάρχουν πιθανά μηχανισμοί οι οποίοι πιθανά ελέγχουν την ποσότητα έκφρασης για πρωτεΐνες όπως η AKT με την χρήση για παράδειγμα ενός feedback regulation μέσω της πρωτεΐνης MTOR (Bhatt et.al, 2010).

Η σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pAKT με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και τα δημογραφικά στοιχεία δείχνει ότι στην συσχέτιση του pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο προκύπτει πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση pAKT στον επιφανειακό καρκίνο, αλλά και στον διηθητικό καρκίνο και στη συνολική ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης (p -value <0.05). Επιπλέον, παρατηρούμε πως συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά η ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT με το στάδιο (p -value < 0.01). Αυτό ακριβώς είναι και κάπως αναμενόμενο αφού όπως είδαμε και παραπάνω εντονότερη έκφραση της AKT παρατηρείται σε περισσότερο προχωρημένες μορφές της νόσου. Για τους δημογραφικούς παράγοντες, δηλαδή κάπνισμα, εγχύσεις, υποτροπές, φύλο, έκθεση και ηλικία σε συσχέτιση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (p -value > 0.05).

Από τη σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με τον βαθμό διαφοροποίησης δεν προκύπτει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (p -value > 0.05). Αντίθετα, από τη σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pAKT με το στάδιο υπάρχει οριακά στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (επίπεδο σημαντικότητας 10%). Παρατηρούμε επίσης πως η ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο δεν συσχετίζονται σημαντικά. Αυτά τα αποτελέσματα επίσης δείχνουν ότι ειδικά στην συσχέτιση μεταξύ σταδίου και εντόπισης της AKT φαίνεται ότι ορθά ο εντοπισμός είναι μεγαλύτερος σε προχωρημένα στάδια της νόσου.

Αποτελέσματα για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση και ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PTEN

Όσο αφορά στην πρωτεΐνη PTEN και πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση του επιφανειακού καρκίνου της κύστης τα δείγματα εκεί που παρουσίασαν πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση είχαν έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση, ενώ στην περίπτωση του διηθητικού καρκίνου με πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση είχαν ασθενής ανοσοϊστοχημική έκφραση. Ωστόσο, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής εντόπισης και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN (p -value > 0.05). Επίσης το αποτέλεσμα αυτό είναι δυνατό να εξηγηθεί λογικά όσο αφορά την PTEN διότι σε περισσότερο επιθετικές μορφές των όγκων παρατηρείται μείωση αυτής της ρυθμιστικής πρωτεΐνης για το μονοπάτι του PI3K (Knowles et.al, 2009).

Βλέπουμε αρχικά όσο αφορά στη συσχέτιση του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου παρατηρούμε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε όλες τις περιπτώσεις (p -value <0.05). Παρατηρούμε βέβαια ότι το αποτέλεσμα δεν μπορεί από μόνο του να μας πει κάτι συγκεκριμένο για την έκφραση της PTEN στον καρκίνο της κύστης καθώς θα περίμενε κανείς να μην βρει ισχυρή έκφραση στους καρκίνους πρώιμης μορφής κάτι το οποίο εδώ δεν παρατηρείται. Επίσης, η συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pTEN με τα δημογραφικά στοιχεία (κάπνισμα, εγχύσεις, υποτροπές, φύλο, έκθεση και ηλικία), ωστόσο δεν αναδεικνύει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (p -value > 0.05).

Επίσης έγινε σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου και τα δημογραφικά στοιχεία. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε πως η ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο δεν συσχετίζονται σημαντικά (p -value >0.05) παρά το ότι σε κάποιες μορφές καρκίνου η απουσία του PTEN από τον πυρήνα προμηνύει γρήγορη εξέλιξη του όγκου κάτι το οποίο δεν διαφοροποιεί αρκετά μεταξύ εντοπισμού και βαθμού της ασθένειας στην δική μας μελέτη (Gimm et.al, 2000).

Αποτελέσματα σύγκρισης της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται στο γονίδιο PAKT με το PTEN

Όσο αφορά στη συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης pAKT και ανοσοϊστοχημικής εντόπισης στο pTEN στον επιφανειακό καρκίνο της κύστης παρατηρούμε πως δεν υπάρχει ασθενής και μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT στην πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση που εξετάζουμε τον διηθητικό καρκίνο.

Στα αποτελέσματά μας βλέπουμε παρατηρούμε πως το 71.4% των περιπτώσεων με έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση στο pTEN στον επιφανειακό καρκίνο έχουν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση στο pAKT. Από τον έλεγχο φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ ανοσοϊστοχημικής έκφρασης pTEN και ανοσοϊστοχημικής εντόπισης pAKT (p-value=0.001).

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα ουσιαστικά επιδεικνύουν μια ρύθμιση της έκφρασης του PTEN ώστε κυρίως να φαίνεται ότι υπάρχει ακόμη και σε προχωρημένο καρκίνο μια σχετικά έντονη έκφραση της PTEN σε σχέση με το AKT. Αυτό ίσως συμβαίνει διότι υπάρχει ένας ανταγωνισμός έκφρασης μεταξύ των μορίων αυτών ενώ κανονικά θα έπρεπε να έχουμε μικρότερη έκφραση της PTEN. Μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση και τοποθέτηση της PTEN στο κύτταρο περιλαμβάνουν το μόριο SUMO και άλλα τέτοια ρυθμιστικά μόρια (Vazquez et.al, 2001),

Αποτελέσματα από τη σύγκριση για την mRNA έκφραση του p85, p110 και pTEN με την ανοσοϊστοχημική έκφραση και εντόπιση του pAKT και pTEN

Όπως είδαμε και στα αποτελέσματα στην παρούσα διατριβή, για να γίνει σύγκριση των δεικτών p85, p110 και pTEN με την ανοσοϊστοχημική έκφραση και εντόπιση των pAKT και pTEN έγινε κατηγοριοποίηση της mRNA έκφρασης σε δύο ομάδες αφού υπολογίστηκε η διάμεση τιμή των φυσιολογικών δειγμάτων για κάθε δείκτη και χρησιμοποιήθηκε για την κατηγοριοποίηση. Όσες παρατηρήσεις είχαν τιμή χαμηλότερη ή ίση από το 50% της διάμεσης τιμής των φυσιολογικών θεωρήθηκε ως η χαμηλά εκφραζόμενη κατηγορία και όσες είχαν τιμή υψηλότερη από το 50% της διάμεσης τιμής των φυσιολογικών θεωρήθηκε ως υψηλά εκφραζόμενη κατηγορία Αυτό που τελικά παρατηρούμε είναι πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση της mRNA έκφρασης για το p85 με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του pAKT (p-value= 0.034, <0.05) και οριακά σημαντική συσχέτιση της mRNA έκφρασης p110 με την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του pTEN (p-value=0.062,<0.10).

Για το αποτέλεσμα αυτό, θα μπορούσαμε να πούμε ότι μεγαλύτερη έκφραση του p85 που αποτελεί και ρυθμιστικό μόριο για την περαιτέρω έκφραση του p110, σημαίνει και μεγαλύτερη έκφραση των μορίων στο υπόλοιπο μονοπάτι, συμπεριλαμβανόμενης και της πρωτεΐνης AKT. Δηλαδή η μεγαλύτερη έκφραση του p85 έχει ως συνεπακόλουθο την αύξηση της έκφρασης της AKT και αυτό είναι ένα σύνηθες γεγονός στον καρκίνο και βέβαια και στον καρκίνο της κύστης (Knowles et.al, 2009, Platt et.al, 2009). Ειδικότερα εμείς βέβαια παρατηρούμε πως στη χαμηλή εκφραζόμενη κατηγορία του p85 η πλειοψηφία των παρατηρήσεων έχουν μέτρια και έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT.

Για το p110 και το PTEN η στατιστική σημαντικότητα που παρουσιάζεται μεταξύ τους το στατιστικό αποτέλεσμα είναι οριακό και δεν μπορεί να οδηγήσει παρά μόνο σε υποθέσεις. Δηλαδή δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην έκφρασή τους όπως θα περίμενε κανείς. Αυτό βέβαια να εξαρτάται και από μηχανισμούς οι οποίοι δρουν είτε επιγενετικά ή με άλλους τρόπους κατά τους οποίους ρυθμίζεται η έκφραση του p110 αλλά και η ανταπόκριση της PTEN (Knowles et.al, 2009). Ειδικότερα παρατηρούμε ότι στη χαμηλή εκφραζόμενη κατηγορία του p110 η πλειοψηφία των παρατηρήσεων έχουν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση στο pTEN. Άρα παρά την οριακή σημαντικότητα της στατιστικής ανάλυσης θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι έχει βιολογική σημασία η

χαμηλή έκφραση του p110 σε σχέση με την υψηλότερη της PTEN, δηλαδή η PTEN ρυθμίζει την έκφραση της p110 (Vazquez et.al, 2001, Santi and Lee, 2010).

Δείγματα με μικτή ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και ταυτόχρονα υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT και συσχέτισή τους με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου

Παράλληλα με όσα παρατηρήσαμε και αναφέραμε προηγούμενα σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήσαμε την ταυτόχρονη έκφραση της AKT σε παράλληλο επίπεδο με την PTEN, γεγονός το οποίο δεν αναμενόταν.

Ειδικότερα η συσχέτιση των δειγμάτων με μικτή ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και ταυτόχρονα υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο έδειξε ότι το 13% των δειγμάτων είχε βαθμό διαφοροποίησης G1, το 40% των δειγμάτων είχε βαθμό διαφοροποίησης G2 και το 47% των δειγμάτων είχε βαθμό διαφοροποίησης G3. Όσο αφορά στο στάδιο της νόσου, το 80% των δειγμάτων βρισκόταν σε στάδιο T1 και το 20% σε στάδιο T2. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των δειγμάτων με πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT ήταν 100% (1) με βαθμό διαφοροποίησης G2 και 100% (1) με στάδιο T1.

Σε όσα δείγματα είχαν μικτή ανοσοϊστοχημική εντόπιση pTEN και υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT, το 17% (3) είχε βαθμό διαφοροποίησης G1, το 33% (5) βαθμό διαφοροποίησης G2 και το 50% (8) βαθμό διαφοροποίησης G3. Η διαφορά αυτών των αποτελεσμάτων με εκείνα που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο έχουν να κάνουν ακριβώς με το ότι στην περίπτωση της μικτής ανοσοϊστοχημικής εντόπισης pTEN και υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση pAKT, η PTEN δεν έχει καταφέρει ακόμη να επιφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα ή ότι η δράση της για κάποιο λόγο παρεμποδίζεται όταν βρίσκεται διάσπαρτη στο κύτταρο και δεν εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα. Γι αυτό τον λόγο και έχουμε σε αυτή την περίπτωση περισσότερα περιστατικά με προχωρημένου σταδίου όγκους.

Όσο αφορά στο στάδιο, το 75% των ασθενών είχε στάδιο T1 και το υπόλοιπο 25% (4) στάδιο T2.

Όσο αφορά στα παραπάνω έχουν παρατηρηθεί κάποιες ανωμαλίες σε διάφορα μέρη σε ότι αφορά την ενεργοποίηση του μονοπατιού του PI3K/Akt και ειδικότερα στην ταυτόχρονη έντονη έκφραση των PTEN και AKT (Liang and Slingerland, 2003). Ειδικότερα, η υψηλότερη έκφραση της PTEN είναι δυνατό να συμβαίνει ως το αποτέλεσμα αρνητικής τροφοδοσίας (negative feedback) από την ενεργοποίηση του μονοπατιού της Akt και όχι το γονίδιο της PTEN να είναι αποκλειστικά υπεύθυνο γι' αυτό. Χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες για να υποδειχθεί αυτό το αποτέλεσμα ακόμη περισσότερο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βιολογία του καρκίνου της κύστης και ειδικά τα μοριακά μονοπάτια της νόσου αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας. Ένα τέτοιο μονοπάτι είναι και το PI3K/AKT το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά μηνυμάτων από εξωκυτταρικά μόρια όπως οι αυξητικοί παράγοντες VEGF και EGF στον πυρήνα του κυττάρου με αποτέλεσμα να επάγονται λειτουργίες όπως η αύξηση των κυττάρων και η αγγειογένεση, λειτουργίες οι οποίες είναι υποβοηθητικές στην επαγωγή του καρκίνου.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν μόρια που σχετίζονται με το μονοπάτι αυτό και πιο συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες AKT, PI3KCA, PTEN. Αναλύθηκαν οι εκφράσεις γονιδίων αυτών τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αναγνωρίστηκαν τρεις παθογόνες μεταλλάξεις της *PIK3CA*, οι δύο από τις οποίες ανευρέθησαν για πρώτη φορά στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της *PTEN* mRNA ήταν ελαττωμένη σε καρκινικούς ιστούς σε σχέση με το φυσιολογικό ουροθήλιο. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις της *PIK3CA* και η ελαττωμένη έκφραση της *PTEN* mRNA διαπιστώθηκαν κυρίως σε επιφανειακούς (μη μυοδιηθητικούς) όγκους. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ασθενής (κυρίως κυτταροπλασματική έκφραση της *PTEN*) σε επιφανειακούς (μη μυοδιηθητικούς) όγκους. Η ισχυρότερη πυρηνική έκφραση της *PTEN* διαπιστώθηκε ότι περιορίζεται σε διηθητικούς όγκους, πιθανώς σε μια προσπάθεια ελέγχου της σημαντικής γονιδιακής αστάθειας που παρατηρείται σε χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνους της ουροδόχου κύστης. Η απουσία αυτών των μεταλλάξεων δεν φαίνεται να επηρεάζει την παθογένεια του όγκου. Αυτό αποτελεί ίσως και ερώτημα προς μελλοντική απάντηση καθώς αυτό το γεγονός αναδεικνύει πιθανό ρόλο για την *PI3KCA* που ακόμη δεν γνωρίζουμε.

Όσον αφορά στην έκφραση των υπόλοιπων πρωτεϊνών που μελετήθηκαν τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, το p85 εκτός ίσως από την διαφοροποίηση που παρουσιάζει μεταξύ γυναικών και ανδρών δεν φαίνεται να παρουσιάζει σε σχέση με περιβαλλοντικούς παράγοντες σημαντική συσχέτιση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια διαφορά στην μεταγραφική δυναμική των γονιδίων p110, PTEN και p85. Ειδικότερα, μεταξύ p110 και PTEN δεν παρατηρήθηκε αναστροφή μεταγραφική δυναμική όταν εξετάστηκαν ανά δύο ενώ όταν εξετάστηκαν ανά τρία παρατηρήθηκε ότι η PTEN υπολειπόταν σε έκφραση της p85 αλλά και της p110.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της PI3K/AKT και συσχέτιση της με το στάδιο του όγκου. Περισσότερες μελέτες θα χρειαστούν για την εξακρίβωση του αν η έκφραση της PAKT αποτελεί προγνωστικό παράγοντα στην περίπτωση του καρκίνου της κύστης. Επίσης ενδιαφέρον παράδοξο αποτελεί και η έκφραση σε ανάλογο βαθμό της PI3KCA και της PTEN. Επίσης σημαντικό αποτέλεσμα είναι δυνατό να θεωρηθεί και η μεικτή έκφραση της pten και η πιθανή συσχέτιση της τοποθεσίας της με το στάδιο της νόσου για παράδειγμα αλλά χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να αποδειχθεί αυτή η συσχέτιση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας είναι το μονοπάτι της PI3K/AKT αποτελεί πιθανό στόχο για την θεραπεία στον καρκίνο της κύστης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν να εξετάσει τη πιθανή εμπλοκή του μοριακού μονοπατιού PI3K/AKT στο καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων από εξήντα πέντε όγκους κύστης και από δεκατρία φυσιολογικούς ιστούς ουροθηλίου της κύστης. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA, ακολουθία Sanger, εξέταση RNA, RT-PCR, καθώς και ανοσοιστοχημεία. Διαπιστώθηκαν τρεις παθογενετικές μεταλλάξεις (2 missense, 1 frameshift) στο εξόνιο 20 του *PIK3CA* {c.3140A>G (p.His1047Arg), c.[3172A>T(;);3174C>T] (p.Ile1058Phe), c.3203dupA (p.Asn1068Lysfs*5)}. Η έκφραση του *PTEN*mRNA διαπιστώθηκε ότι ήταν μειωμένη στο καρκίνο της κύστης σε σύγκριση με το φυσιολογικό ουροθήλιο της κύστης. Η έκφραση του p-AKT βρέθηκε αυξημένη στο κυτταρόπλασμα και το πυρήνα σε όγκους επιφανειακούς (μη μυοδιηθητικούς) σε αντίθεση με τους μυοδιηθητικούς όγκους όπου η έκφραση του p-AKT βρέθηκε μειωμένη και περιορισμένη κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η έκφραση του *PTEN* διαπιστώθηκε ότι ήταν ασθενής και κυρίως κυτταροπλασματική στους επιφανειακούς όγκους (μη μυοδιηθητικούς), ενώ στους μυοδιηθητικούς ήταν ισχυρότερη και κυρίως πυρηνική.

Συμπερασματικά, το μοριακό μονοπάτι PI3K/AKT εμπλέκεται στην εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και η μέτρηση μορίων του (*PIK3CA*, p-AKT, *PTEN*) σε συνδυασμό και με άλλους βιοδείκτες θα μπορούσε να έχει προγνωστικό και θεραπευτικό ρόλο.

ABSTRACT

The purpose of this PhD thesis was to examine the involvement of specific components of the PI3K/AKT pathway in urinary bladder cancer. Samples from sixty-five tumors and thirteen normal bladder tissues were collected. Genomic DNA isolation from snap-frozen and paraffin-embedded laser-microdissected tissues was followed by Sanger sequencing, whereas total RNA was purified for use in RT-PCR analyses. Immunohistochemistry was carried out on sections of paraffin-embedded biopsy material.

Three pathogenic mutations (two missense and one frameshift) were identified in exon 20 of *PIK3CA* {c.3140A>G (p.His1047Arg), c.[3172A>T(;3174C>T] (p.Ile1058Phe), c.3203dupA (p.Asn1068Lysfs*5)} after laser capture microdissection, whereas *PTEN* mRNA expression was found to be downregulated in bladder cancer tissues compared to normal bladder urothelium. Upregulation of cytoplasmic and nuclear p-AKT expression was detected in low grade tumors, whereas in muscle invasive tumors, p-AKT was shown to be downregulated and confined to the cytoplasm. PTEN expression was weak and mainly cytoplasmic in superficial tumors, but stronger and nuclear in the muscle invasive tumors.

In conclusion, PI3K/AKT pathway activation is involved in bladder cancer initiation and progression. In this context, *PIK3CA*, p-AKT and nuclear PTEN could be used along with other biomarkers for prognostic purposes and for the selection of appropriate therapy in the clinical management of bladder cancer.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Abdel-Karim IA, Giles FJ (2008). Mammalian target of rapamycin as a target in hematological malignancies. *Curr Probl Cancer*, 32: 161-77
2. Ahmad AN, Hainsworth A, Williams AB, Schizas AM (2015) A review of functional pelvic floor imaging modalities and their effectiveness. *Clin Imaging*, S0899-7071(15)00057-1
3. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24: 7455-64.
4. Askham JM, Platt F, Chambers PA, et al (2010). AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K. *Oncogene*, 29:150–155
5. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, et al (1999). Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer*, 80:904–908
6. Azuma,M., Momose,H. and Oyasu,R. (1990) In vitro malignant conversion of low-grade rat urinary bladder carcinoma cells by exposure to N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res.*, 50, 7062–7067
7. Bellet D, Lazar V, Bièche I, Paradis V, Giovangrandi Y, Paterlini P, Lidereau R, Bedossa P, Bidart JM, Vidaud M (1997). Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer Res*, 57:516-23
8. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991)A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 254:274-277
9. Bellmunt J, Albiol S, Suárez C, Albanell J (2009). Optimizing therapeutic strategies in advanced bladder cancer: update on chemotherapy and the role of targeted agents.*Crit Rev Oncol Hematol*, 69:211-22
10. Bhatt AP, Bhende PM, Sin SH, Roy D, Dittmer DP, Damania B (2010). Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood*, 115:4455-63
11. Birder LA (2013). Nervous network for lower urinary tract function.*Int J Urol*, 20:4-12
12. Booth,C., Harnden,P., Trejdosiewicz,L.K., Scriven,S., Selby,P.J. and Southgate,J. (1997) Stromal and vascular invasion in an human in vitro bladder cancer model. *Lab. Invest*, 76 , 843–857.
13. Booth,C., Harnden,P., Selby,P.J. and Southgate,J. (2002) Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGFbeta-1 in the normal and neoplastic urinary bladder. *J. Pathol.* , 198 , 359–368
14. Bozucic L, Surucu B, Hynx D, Hemmings BA (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell*, 30: 203–13
15. Brait M, Munari E, LeBron C, Noordhuis MG, Begum S, Michailidi C, Gonzalez-Roibon N, Maldonado L, Sen T, Guerrero-Preston R, Cope L, Parrella P, Fazio VM, Ha PK, Netto GJ, Sidransky D, Hoque MO (2013). Genome-wide methylation profiling and the PI3K-AKT pathway analysis associated with smoking in urothelial cell carcinoma. *Cell Cycle*, 12:1058-70
16. Bubeník J, Baresová M, Viklický V, Jakoubková J, Sainerová H, Donner J (1973). Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer*, 11:765-73
17. Burgess EF (2015). Individualized management of advanced bladder cancer: Where do we stand?*Urol Oncol*, 33:187-195

18. Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Park JI, Chae KS, Kim HJ, Chi SG (2003). Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer*, 104:318-27
19. Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296: 1655-7
20. Carballido EM, Rosenberg JE (2014). Optimal treatment for metastatic bladder cancer. *Curr Oncol Rep*, 16:404
21. Caron E, Ghosh S, Matsuoka Y, Ashton-Beaucage D, Therrien M, Lemieux S, Perreault C, Roux PP, Kitano H (2010). A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Mol Syst Biol*, 6:453
22. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE (2007). Nature, 448(7):439-44. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.
23. Castillo-Martin, M., Domingo-Domenech, J., Karni-Schmidt, O., Matos, T., & Cordon-Cardo, C. (2010). Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol*, 28:401–408
24. Chalhoub, N., & Baker, S. J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev*, 4:127–150.
25. Chang, F.L. and Lai, M.D. (2001) Various forms of mutant p53 confer sensitivity to cisplatin and doxorubicin in bladder cancer cells. *J. Urol.*, 166, 304–310
26. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 17: 590-603
27. Chen CH, Chen RJ (2011). Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc*, 110:275-89
28. Choo AY, Blenis J (2009). Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle*, 8: 567-72
29. Cizkova M, Vacher S, Meseure D, Trassard M, Susini A, Mlcuchova D, Callens C, Rouleau E, Spyrtos F, Lidereau R, Bièche I (2013). PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer*, 13:545
30. Coffey PJ, Woodgett JR (1991). Molecular cloning and characterization of a novel protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*, 201: 475-481
31. Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Ezer A, Noyan T, Karakayali H, Haberal M (2008). Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *Am J Surg.*, 195:719-25
32. Collins L, Sawyer GJ, Zhang XH, Gustafsson K, Fabre JW (2000). In vitro investigation of factors important for the delivery of an integrin-targeted nonviral DNA vector in organ transplantation. *Transplantation*, 69:1168-76
33. Díaz De Ståhl T, Segersten U, Malmström PU (2008). Molecular genetics of bladder cancer: an update. *Minerva Urol Nefrol*, 60:205-16
34. Downes CP, Bennett D, McConnachie G, Leslie NR, Pass I, MacPhee C, Patel L, Gray A (2001). Antagonism of PI 3-kinase-dependent signalling pathways by the tumour suppressor protein, PTEN. *Biochem Soc Trans*, 29: 846-51
35. Duggan BJ, Cotter FE, Kelly JD, Hamilton PW, McCallion K, Harkin D, Gardiner T, Anderson N, Keane PF, Johnston SR, Williamson KE (2001). Antisense Bcl-2 oligonucleotide uptake in human transitional cell carcinoma. *Eur Urol*, 40:685-95

36. EAUCAN 1998. Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union. [Http://www-dept.iarc.fr/eucan/eucan.htm](http://www-dept.iarc.fr/eucan/eucan.htm)
37. El-Abbady AA, Shoukry MS, Hanno AG, Younis LK, Abdel-Rahman M (2002). Repeated transurethral resection of recurrent superficial bladder tumors--does it affect the spread and stage of the tumor? *Scand J Urol Nephrol*, 36:60-4
38. Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 7: 606-19
39. Estilo CL, O-Charoenrat P, Ngai I, Patel SG, Reddy PG, Dao S, Shaha AR, Kraus DH, Boyle JO, Wong RJ, Pfister DG, Hurn JM, Zlotolow IM, Shah JP, Singh B (2003). The role of novel oncogenes squamous cell carcinoma-related oncogene and phosphatidylinositol 3-kinase p110alpha in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res*, 9:2300-6
40. Feo-Jones D, Barnett SF, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Leander KR, McAvoy E, Robinson RG, Duggan ME, Lindsley CW, Zhao Z, Huber HE, Jones RE (2005). Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members. *Mol Cancer Ther* 4: 271-279
41. Fingar DC, Blenis J (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23: 3151-71
42. Foster KG, Fingar DC (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem*, 285: 14071-7
43. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC (2011). Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, 306:737-45
44. Garcia JA, Dreicer R (2006). Systemic chemotherapy for advanced bladder cancer: update and controversies. *J Clin Oncol*, 24:5545-51
45. Gartrell BA, Sonpavde G. Emerging drugs for urothelial carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs*, 18:477-94
46. Geering B, Cutillas PR, Nock G, Gharbi SI, Vanhaesebroeck B (2007). Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 7809-7814
47. Gericke A, Munson M, Ross AH (2006). Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene*, 374:1-9.
48. Georgescu MM (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*, 1: 1170-7.
49. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H, Eng C (2000). Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol*, 156:1693-700
50. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H, Eng C (2000). Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol*, 156:1693-700
51. Gkirlimis K, Miliadou A, Koukourakis G, Sotiropoulou-Lontou A (2013). Small cell carcinoma of the bladder: a search of the current literature. *J BUON*. 2013, 18:220-6
52. Gray M, Sims TW (2004). NMP-22 for bladder cancer screening and surveillance. *Urol Nurs*, 24:171-2
53. Griffiths TR (2013). Current perspectives in bladder cancer management. *Int J Clin Pract*, 67:435-48

54. Gunther, J.H., Jurczok, A., Wulf, T., Brandau, S., Deinert, I., Jocham, D. and Bohle, A. (1999) Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res* 59, 2834–2837
55. Günzl P, Schabbauer G (2008). Recent advances in the genetic analysis of PTEN and PI3K innate immune properties. *Immunobiology*, 213: 759-65
56. Harik LR, O'Toole KM (2012). Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder. *Arch Pathol Lab Med*, 136:721-34
57. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T (2001). Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol*, 18: 493-7
58. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006). *Biochem Soc Trans*, 34:647–62
59. Hemminki K, Bermejo JL, Ji J, Kumar R (2011). Familial bladder cancer and the related genes. *Curr Opin Urol*, 21386-92.
60. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 4: 988-1004
61. Hill MM, Feng J, Hemmings BA (2002). Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Curr Biol*, 12: 1251–5
62. Hirsch E, Costa C, Ciruolo E (2007). Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol*, 194: 243–256
63. Hoffman, R.M. (1999) Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest. New Drugs* 17, 343–359
64. Hou W, Liu J, Chen P, Wang H, Ye BC, Qiang F (2014). Mutation analysis of key genes in RAS/RAF and PI3K/PTEN pathways in Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 8:1249-1254
65. Huang CH, Mandelker D, Gabelli SB, et al (2008). Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/ p85alpha. *Cell Cycle*, 7:1151–1156
66. Ismail SI, Mahmoud IS, Msallam MM, Sughayer MA (2010). Hotspot mutations of PIK3CA and AKT1 genes are absent in multiple myeloma. *Leuk Res*, 34:824-6
67. Iyengar S, Clear A, Bödör C, Maharaj L, Lee A, Calaminici M, Matthews J, Iqbal S, Auer R, Gribben J, Joel S (2013). P110 α -mediated constitutive PI3K signaling limits the efficacy of p110 δ -selective inhibition in mantle cell lymphoma, particularly with multiple relapse. *Blood*, 121:2274-84
68. Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, Hanrahan AJ, Ostrovnya I, Balar AV, Kim PH, Lin O, Weinhold N, Sander C, Zabor EC, Janakiraman M, Garcia-Grossman IR, Heguy A, Viale A, Bochner BH, Reuter VE, Bajorin DF, Milowsky MI, Taylor BS, Solit DB (2013). Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *J Clin Oncol*, 31:3133-40
69. Jani AB, Efsthathiou JA, Shipley WU (2015). Bladder preservation strategies. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29:289-300
70. Jiang BH, Liu LZ (2008). PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1784: 150-8
71. Johnson, M.D., Bryan, G.T. and Reznikoff, C.A. (1985) Serial cultivation of normal rat bladder epithelial cells in vitro. *J. Urol.*, 133, 1076–1081
72. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 4171-4175.
73. Jordan EJ, Iyer G (2015). Targeted therapy in advanced bladder cancer: what have we learned? *Urol Clin North Am*, 42:253-62

74. Juanpere N, Agell L, Lorenzo M, de Muga S, López-Vilaró L, Murillo R, Mojal S, Serrano S, Lorente JA, Lloreta J, Hernández S (2012). Mutations in FGFR3 and PIK3CA, singly or combined with RAS and AKT1, are associated with AKT but not with MAPK pathway activation in urothelial bladder cancer. *Hum Pathol*, 43:1573-82
75. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, Hedvat CV, Traina TA, Solit D, Gerald W, Moynahan ME(2013). PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 15:5049-5059
76. Kanda S, Kanetake H, Miyata Y (2009). Loss of PTEN function may account for reduced proliferation pathway sensitivity to LY294002 in human prostate and bladder cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135:303–311
77. Knowles, M.A. and Jani, H. (1986) Multistage transformation of cultured rat urothelium: the effects of N-methyl-N-nitrosourea, sodium saccharin, sodium cyclamate and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*, 7, 2059–2065.
78. Knowles MA, Platt FM, Ross RL, et al (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 28:305–316
79. Kostakis GC, Papadogeorgakis N, Koumaki V, Kamakari S, Koumaki D, Alexandridis C (2010). Absence of hotspot mutations in exons 9 and 20 of the PIK3CA gene in human oral squamous cell carcinoma in the Greek population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 109:e53-8
80. Kuzaka B, Pudełko P, Powała A, Górnicka B, Radziszewski P (2014). Nephrogenic adenoma of the urinary bladder: a report of three cases and a review of the literature. *Ann Transplant*, 19:153-6
81. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP (1999). "Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association". *Cell* 99: 323–34
82. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005). PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 24:1477-80.
83. Lee SK, Dawson J, Lee JA, Osman G, Levitin MO, Guzel RM, Djamgoz MB (2014). Management of cancer pain: 1. Wider implications of orthodox analgesics. *Int J Gen Med*, 7:49-58
84. Leow JJ, Orsola A, Chang SL, Bellmunt J(2014). A contemporary review of management and prognostic factors of upper tract urothelial carcinoma. *Cancer Treat Rev*, 41, 310-9
85. Letašiová S, Medve'ová A, Šovčíková A, Dušinská M, Volkovová K, Mosoiu C, Bartonová A. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Health*, 11 Suppl 1:S11
86. Liang J, Slingerland JM (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2): 339-45
87. Lian Z, Di Cristofano A (2005). Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene*, 24: 7394-400
88. Liao Y, Hung MC (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res*, 2: 19-42.
89. Lokeshwar VB, Soloway MS (2001). Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol*, 165:1067-77
90. Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, et al (2006). PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res*, 66:7401–7404

91. Lucca I, Leow JJ, Shariat SF, Chang SL (2015). Diagnosis and management of upper tract urothelial carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29:271-88
92. Lukk M, Kapushesky M, Nikkilä J, Parkinson H, Goncalves A, Huber W, Ukkonen E, Brazma A: A global map of human gene expression., *Nat Biotechnol* 2010, 28:322-324
93. Luo Y, Sun G, Dong X, Wang M, Qin M, Yu Y, Sun X (2015). Isorhamnetin Attenuates Atherosclerosis by Inhibiting Macrophage Apoptosis via PI3K/AKT Activation and HO-1 Induction. *PLoS One*, 10:e0120259
94. Malats N, Real FX (2015). Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29:177-89
95. Masters, J.R., Hepburn, P.J., Walker, L., Highman, W.J., Trejdosiewicz, L.K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B.T., Riddle, P.R. and Franks, L.M. (1986) Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res.*, 46, 3630–3636
96. Masters, J.R., Thomson, J.A., Daly-Burns, B. et al. (2001) Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 8012–8017
97. Matheny RW Jr, Adamo ML (2009). Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp Biol Med (Maywood)*; 234: 1264-70
98. Matsushita K, Cha EK, Matsumoto K, Baba S, Chromecki TF, Fajkovic H, Sun M, Karakiewicz PI, Scherr DS, Shariat SF (2011). Immunohistochemical biomarkers for bladder cancer prognosis. *Int J Urol*, 18:616-29
99. Mazzucchelli R, Scarpelli M, Galosi AB, Di Primio R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Montironi R (2014). Pathology of upper tract urothelial carcinoma with emphasis on staging. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 27:509-16
100. McIlwrath, A.J., Vasey, P.A., Ross, G.M. and Brown, R. (1994) Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res.*, 54, 3718–3722.
101. Menon S, Manning BD (2008). Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27 Suppl 2: S43-51.
102. Molina JR, Morales FC, Hayashi Y, Aldape KD, Georgescu MM (2010). Loss of PTEN binding adapter protein NHERF1 from plasma membrane in glioblastoma contributes to PTEN inactivation. *Cancer Res*, 70: 6697-703
103. Momose H, Kurosu H, Tsujimoto N, Kontani K, Tsujita K, Nishina H, Katada T (2003). Dual phosphorylation of phosphoinositide 3-kinase adaptor Grb2-associated binder 2 is responsible for superoxide formation synergistically stimulated by Fc gamma and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors in differentiated THP-1 cells. *J Immunol*, 171: 4227-34
104. Mooso BA, Vinall RL, Mudryj M, Yap SA, deVere White RW, Ghosh PM (2015). The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence. *J Urol*, 193:19-29
105. Oka N, Tanimoto S, Taue R, et al (2006). Role of phosphatidylinositol-3 kinase/ Akt pathway in bladder cancer cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci*, 97:1093–1098
106. Okamoto, M., Kawai, K., Reznikoff, C.A. and Oyasu, R. (1996) Transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by hydrogen peroxide. *Cancer Res.*, 56, 4649–4653
107. Orntoft TF (1990). Expression and biosynthesis of ABH-related carbohydrate antigens in normal and pathologic human urothelium. *APMIS*; 17:1-34
108. Osaki M, Oshimura M, Ito H (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9: 667-676

109. Owens CL, Vandebussche CJ, Burroughs FH, Rosenthal DL(2013). A review of reporting systems and terminology for urine cytology. *Cancer Cytopathol*, 121:9-14
110. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*, 100:657-66
111. Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L, Green A, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D (2010). Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 95: 819-28
112. Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D (2002). Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene*, 21:6587–97
113. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, et al (2001). The phosphatidylinositol 3-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res*, 61:7426–7429
114. Platt FM, Hurst CD, Tayler CF, et al (2009). Spectrum of phosphatidylinositol 3- kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 15:6008–6017
115. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465: 1033-8
116. Premo C, Apolo AB, Agarwal PK, Citrin DE (2015). Trimodality therapy in bladder cancer: who, what, and when? *Urol Clin North Am*, 42:169-80
117. Prodromidis G, Nikitakis NG, Sklavounou A (2013). Immunohistochemical Analysis of the Activation Status of the Akt/mTOR/pS6 Signaling Pathway in Oral Lichen Planus. *Int J Dent*. 2013:743456
118. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, et al (2009). Inactivation of p53 and PTEN promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev*, 23:675–680
119. Reuter VE (2006). The pathology of bladder cancer. *Urology*, 67(3 Suppl 1):11-7
120. Ribeiro, J.C., Barnetson, A.R., Fisher, R.J., Mameghan, H. and Russell, P.J. (1997) Relationship between radiation response and p53 status in human bladder cancer cells [Erratum (1997) *Int. J. Radiat. Biol.*, 72, 760]. *Int. J. Radiat. Biol.*, 72, 11–20
121. Riener MO, Bawohl M, Clavien PA and Jochum W (2008) Rare PIK3CA hotspot mutations in carcinomas of the biliary tract. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 363-367.
122. Rink M, Zabor EC, Furberg H, Xylinas E, Ehdaie B, Novara G, Babjuk M, Pycha A, Lotan Y, Trinh QD, Chun FK, Lee RK, Karakiewicz PI, Fisch M, Robinson BD, Scherr DS, Shariat SF (2013). Impact of smoking and smoking cessation on outcomes in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. *Eur Urol*, 64:456-64
123. Ríos-Moreno MJ, Jaramillo S, Díaz-Delgado M, Sánchez-León M, Trigo-Sánchez I, Padillo JP, Amérigo J, González-Cámpora R (2011). Differential activation of MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways and IGF1R expression in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res*, 31: 3019-25
124. Robertson GP (2005). *Cancer Met Rev*, 24: 273–285
125. Saal LH, Johansson P, Holm K, et al (2007). Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:7564–7569

126. Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Takahira T, Yamamoto H, Tanaka K, Matsuda S, Sakamoto A, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M (2004). PTEN and other tumor suppressor gene mutations as secondary genetic alterations in synovial sarcoma. *Oncol Rep*, 11: 1011-5
127. Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*, 7: 561-73
128. Samuels Y, Velculescu VE (2004). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*, 3:1221-4
129. Santi SA, Lee H (2010). The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298:C580-91
130. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307: 1098-101
131. Sarkar, S., Julicher, K.P., Burger, M.S. et al. (2000) Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer Res.*, 60, 3862–3871
132. Sarris EG, Saif MW, Syrigos KN (2012). The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*, 5:1236-64.
133. Seront E, Pinto A, Bouzin C, Bertrand L, Machiels JP, Feron O (2013). PTEN deficiency is associated with reduced sensitivity to mTOR inhibitor in human bladder cancer through the unhampered feedback loop driving PI3K/Akt activation. *Br J Cancer*, 109: 1586-92
134. Serrano C, Morales R, Suárez C, Núñez I, Valverde C, Rodón J, Humbert J, Padrós O, Carles J (2012). Emerging therapies for urothelial cancer. *Cancer Treat Rev*, 38:311-7
135. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*, 21:99-102
136. Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F, Jiang BH (2004). Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *J Biol Chem*, 279:45643-51
137. Sonpavde G, Jones BS, Bellmunt J, Choueiri TK, Sternberg CN (2015). Future directions and targeted therapies in bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29:361-76
138. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 15: 356-62
139. Sun M, Trinh QD (2015). Diagnosis and staging of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29:205-18
140. Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Ikenoue T, Tateishi K, Obi S, Kawabe T, Yokosuka O and Omata M. Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Oncogene*, 25, 2950–2952
141. Taniguchi CM, Winnay J, Kondo T, Bronson RT, Guimaraes AR, Alemán JO, Luo J, Stephanopoulos G, Weissleder R, Cantley LC, Kahn CR (2010). The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. *Cancer Res*, 70:5305-5315

142. Tato I, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL (2011). Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J Biol Chem*, 286: 6128-42
143. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*, 15:7-24
144. Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y (2006). Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer*, 13: 137-44.
145. Turker P, Turkeri L (2013) Treatment of bacillus Calmette-Guerin refractory non-muscle invasive bladder cancer.. *Arch Esp Urol*, 66:833-40.
146. Tzenaki N, Andreou M, Stratigi K, Vergetaki A, Makrigiannakis A, Vanhaesebroeck B, Papakonstanti EA (2012). High levels of p110 δ PI3K expression in solid tumor cells suppress PTEN activity, generating cellular sensitivity to p110 δ inhibitors through PTEN activation. *FASEB J*, 26:2498-508.
147. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*, 253: 239–54.
148. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 329-341 (2010)
149. Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem*, 276:48627-30
150. Viglietto G, Amodio N, Malanga D, Scrima M, De Marco C. Contribution of PKB/AKT signaling to thyroid cancer. *Frontiers in Bioscience* 16, 1461-1487, 2011
151. Volanis D, Papadopoulos G, Doumas K, Gkialas I, Delakas D (2011). Molecular mechanisms in urinary bladder carcinogenesis. *J BUON*, 16:589-601
152. Wang L, Hu H, Pan Y, Wang R, Li Y, Shen L, Yu Y, Li H, Cai D, Sun Y, Chen H. PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wildtype subgroup. *PLoS One*. 2014 Feb 12;9(2):e88291.
153. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*, 428: 332-7
154. Williams SK, Hoenig DM, Ghavamian R, Soloway M (2010). Intravesical therapy for bladder cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 11:947-58
155. World health organization (WHO) (2015). www.who.int.
156. Wu X, Patterson S, Hawk E (2011). Chemoprevention--history and general principles. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25(4-5):445-59
157. Xia C, Meng Q, Cao Z, Shi X, Jiang BH (2006). Regulation of angiogenesis and tumor growth by p110 alpha and AKT1 via VEGF expression. *J Cell Physiol*, 209:56-66
158. Zálešák M, Blažíček P, Gablovský I, Ledvényiová V, Barteková M, Ziegelhöffer A, Ravingerová T (2015). Impaired PI3K/Akt signaling as a potential cause of failure to precondition rat hearts under conditions of simulated hyperglycemia. *Physiol Res*. 2015 Mar 24. [Epub ahead of print]
159. Zhang F, Zhang X, Li M, Chen P, Zhang B, Guo H, Cao W, Wei X, Cao X, Hao X, Zhang N (2010). mTOR complex component Rictor interacts with PKCzeta and regulates cancer cell metastasis. *Cancer Res*, 70: 9360-70.
160. Zhao L, Vogt PK (2007). Hot-spot mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. *Cell Cycle*, 9:596–600

161. Zlatev DV, Altobelli E, Liao JC (2015). Advances in imaging technologies in the evaluation of high-grade bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 42:147-57