



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

---

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ APC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ  
ΜΕ ΣΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ  
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ E2F1 ΚΑΙ P14ARF»**

ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΓΕΡΑΣΙΜΟΥ ΛΟΥΤΑΣ  
Υπότροφος Κ.Ι. Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης

2023

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Θεοδοσοπούλου Ελένη (Ε)
2. Κακλαμάνος Ιωάννης
3. Μαριόλης-Σαψάκος Θεόδωρος

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Θεοδοσοπούλου Ελένη (Ε)
2. Κακλαμάνος Ιωάννης
3. Μαριόλης-Σαψάκος Θεόδωρος
4. Μυριανθέας Παύλος
5. Κωνσταντίνου Ευάγγελος
6. Πανουτσόπουλος Γεώργιος
7. Βασιλόπουλος Γεώργιος

Στις Πηνελόπη, Μαρίτση, Αθηναΐς

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Κα Θεοδοσοπούλου Ελένη, που όχι μόνο με εμπιστεύτηκε στην εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής, αλλά με στήριξε ηθικά και επιστημονικά στην διεκπεραίωση των υποχρεώσεων της παρούσας εργασίας. Ήταν δίπλα μου όλο το δύσκολο διάστημα συλλογής δεδομένων όπως και στην πραγματοποίηση της έρευνας. Όχι μόνο ως επιστήμονας, αλλά και ως άνθρωπος, με αγάπη και κατανόηση, στο έργο μου και στο πρόσωπό μου. Θα αποτελεί πάντα για μένα πρότυπο εργατικότητας και συνεργασίας, ενώ οι αρχές της ως επιστήμονα και ως άνθρωπο θα με ακολουθούν στη ζωή μου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ το Τμήμα Νοσηλευτικής του ΕΚΠΑ, για την κατανόηση που έδειξαν στα προβλήματα που προέκυψαν. Υπήρχαν πολύ δύσκολες στιγμές στον δρόμο και πολλές φορές αντιταχθήκαμε με χαμόγελο και υπομονή. Προσωπικό ευχαριστώ στον Κο Θεοδωρόπουλο Αθανάσιο, έναν άνθρωπο με ενσυναίσθηση και μεγάλη αγάπη για το καθημερινό δύσκολο έργο του. Εκεί που για άλλους υπήρχαν προβλήματα αυτός έδινε μόνο λύσεις, μένοντας πολλές φορές πέραν του εργάσιμου ωραρίου.

Η βοήθεια με εξοπλισμό και εξιδεικευμένη γνώση, από το Τμήμα Ανοσοϊστοχημείας, της Ιατρικής του ΕΚΠΑ ήταν πολύ μεγάλη. Χρειάστηκε χρόνο για να γίνουν κατανοητές οι διαδικασίες μελέτης των γονιδίων, όπως και οι τρόποι με τους οποίους λαμβάνεται, αποθηκεύεται και αναλύεται ο ιστός. Οι Καθηγητές του Τμήματος και οι επιστημονικοί τους συνεργάτες στάθηκαν δίπλα μας, για την εκπόνηση αυτής της ερευνητικής μελέτης.

Επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Κο Παναγιώτη Μενούνο. Βασικό πυλώνα, στην εξαγωγή της έρευνας, τόσο στην ανάλυση του έργου, όσο και στις καθοδήγηση με τις εύστοχες υποδείξεις του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την οικογένειά μου που με στήριξε με τον τρόπο της, όλα αυτά τα χρόνια. Τόσο τη σύζυγό μου Πηνελόπη, όσο και τα παιδιά μου Μαρία-Χαριτίνη και Αθηναίς και τους γονείς μου Γεράσιμο και Χαριτίνη.

Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου αν δεν ευχαριστούσα θερμά το Κοινωνικό Ίδρυμα Αλέξανδρου Ωνάση, που χάρη στην οικονομική ενίσχυση που μου έδωσε επί 4 συναπτά έτη, κατάφερα να καλύψω οικονομικά ένα

μεγάλο κομμάτι των απαιτήσεων της παρούσας έρευνας. Συγκεκριμένα ευχαριστώ τις Κα Παπαθάνου Φανή, Κα Ζαρκαλή Ντίνα και Κα Χαντζόλου Αντιγόνη, για την όλη επικοινωνία και συνεργασία που είχαμε. Μεγάλη η προσφορά του Ιδρύματος Αλέξανδρος Ωνάσης στον σχεδιασμό και στην ολοκλήρωση ανάλογων διατριβών και προβολή του Ελληνικού επιστημονικού έργου στο Παγκόσμιο προσκήνιο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	8
Συνομογραφίες .....	11
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	12
SUMMARY .....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	15
ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (ΚΠΕ) .....	15
1.1 Εισαγωγή.....	15
1.2 Ανατομία Παχέος Εντέρου .....	17
1.3 Αγγείωση .....	18
1.3.1 Αρτηρίες .....	18
1.3.2 Φλέβες.....	20
1.3.3 Λεμφική Παροχέτευση .....	20
1.4 Παθήσεις Παχέος Εντέρου που Συσχετίζονται με ΚΠΕ.....	21
1.4.1 Φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου.....	21
1.4.1.1 Ελκώδης Κολίτιδα .....	21
1.4.1.2 Νόσος του Crohn .....	22
1.4.2 Κληρονομικά Σύνδρομα.....	23
1.5 Αίτια ΚΠΕ .....	25
1.6 Εξωγενείς Παράγοντες Κινδύνου.....	26
1.6.1 Περιβάλλον.....	26
1.6.2 Διατροφή .....	29
1.6.3 Ιοί.....	32
1.6.4 Δημογραφικοί Παράγοντες .....	34
1.7 Σταδιοποίηση.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	38
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	38
2.1. Βιολογία Καρκινικού Κυττάρου.....	38
2.2 Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός και Απόπτωση .....	39
2.3 Καρκινικά Γονίδια και Μονοπάτια.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	44
ΤΟ APC ΣΤΟΝ ΚΠΕ .....	44
3.1 Η δομή και η λειτουργία της πρωτεΐνης.....	44
3.2 Η συμβολή της πρωτεΐνης στον κυτταρικό κύκλο.....	45
3.3 Η φαινοτυπική και γονοτυπική έκφραση της πρωτεΐνης .....	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	47
ΤΟ Ε2F1 ΣΤΟΝ ΚΠΕ .....	47
4.1 Δομή και Λειτουργία πρωτεΐνης .....	47
4.2 Συμβολή της πρωτεΐνης στον κυτταρικό κύκλο .....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	50
ΤΟ Ρ14ΑΡF ΣΤΟΝ ΚΠΕ .....	50
5.1 Δομή και Λειτουργία πρωτεΐνης .....	50
5.2 Συμβολή της Ρ14ΑΡF στον κυτταρικό κύκλο .....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	52
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΚΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΙ67 .....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	55
7.1 Σκοπός.....	55
7.2 Υλικό και Μέθοδος.....	57
7.3 Ανάλυση.....	66
7.4 Αποτελέσματα.....	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	77
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.....	83
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	85
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	116

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η νεοπλασματική νόσος του παχέος εντέρου αποτελεί μια κυτταρική διεργασία η οποία επηρεάζεται τόσο από το γενετικό υπόβαθρο του ασθενή, όσο και από το μικροβίωμα (μικροβιακή χλωρίδα) του παχέος εντέρου και σχετίζεται με ένα λιγότερο ποικιλόμορφο μικροβίωμα.

Η έναρξη, η εξέλιξη και η μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) σηματοδοτεί μια σειρά γενετικών συμβάντων. Μελετώντας τα στάδια αυτά, μπορούν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες για την ενημέρωση και εφαρμογή των θεραπευτικών προσεγγίσεων. Με τον τρόπο αυτό, η ανάλυση της συσχέτισης γονιδίων σε σχέση με τον ΚΠΕ, μπορεί να σημάνει την ύπαρξη βιοδεικτών, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς και της πρόγνωσης του καρκίνου, πέρα από τη σταδιοποίησή του.

Οι ερευνητές-επιστήμονες έχουν επίγνωση του καρκίνου για περισσότερα από 4000 χρόνια, η γνώση μας όμως για αυτόν έχει βελτιωθεί σημαντικά μόλις τα τελευταία 200 χρόνια. Η μικροσκοπική ανατομία των όγκων κατά το 19ο αιώνα αποκάλυψε επιπλέον πως η μορφολογία ακόμη και ενός μοναδικού όγκου μπορεί να είναι αξιοσημείωτα ετερογενής. Σύμφωνα με μελέτες η ογκογένεση προέρχεται από ένα μόνο κύτταρο και τα θυγατρικά του κύτταρα ποικίλουν τόσο πολύ διότι όταν διαιρούνται συσσωρεύουν περαιτέρω μεταλλάξεις που τα καθιστούν από γενετική άποψη διαφορετικά μεταξύ τους. Ταυτόχρονα, το μικροπεριβάλλον του όγκου ποικίλει και αυτό επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο συμπεριφέρεται κάθε νεοπλασματικό κύτταρο.

Επίσης τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (ΚΚΚ) μετά από την συνδυαστική θεραπευτική αντιμετώπιση, είναι κύτταρα που έχουν αποσπασθεί από τον πρωτογενή όγκο και παρασύρονται με τη ροή του αίματος ή της λέμφου. Η περιεκτικότητα του αίματος σ' αυτά είναι πολύ μικρή, αλλά αυτά είναι τα κύτταρα που θα προδιαγράψουν την πορεία της νόσου και το μέλλον του αρρώστου.

Η ανίχνευση και η απομόνωση τους είναι προτεραιότητα για τα περισσότερα ερευνητικά κέντρα εξατομικευμένης διαγνωστικής και θεραπευτικής προσέγγισης. Η μεθοδολογία αυτή παρέχει 86,6% ευαισθησία



και 83,3% ειδικότητα στην αναγνώριση και ταυτοποίηση των ΚΚΚ. Τα υψηλά ποσοστά επιτυχίας οφείλονται στο ότι τα ΚΚΚ δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία με αντισώματα αναγνώρισής τους, φίλτρα και άλλες μεθόδους απομόνωσης και διατηρούν όλη τους τη ζωτικότητα και τις ιδιότητες. Στη συνέχεια τα ΚΚΚ καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά, με στόχο τον προσδιορισμό της κατάλληλης για κάθε περίπτωση, θεραπείας η οποία μπορεί να γίνει με τη δοκιμασία χημειοευαισθησίας των καλλιεργημένων κυττάρων της νεοπλασματικής νόσου. Η προφανής όμως λύση θα ήταν να αναπτυχθούν θεραπείες που στοχεύουν ειδικά στα νεοπλασματικά βλαστοκύτταρα (CSCs).

Αυτό όμως δεν είναι εύκολο, διότι οι ερευνητές εξακολουθούν να πασχίζουν να βρουν αξιόπιστες μεθόδους για να εντοπίσουν ποια κύτταρα σε έναν όγκο είναι τα CSCs, καθώς αφορά εκείνους τους τύπους καρκίνου όπου ισχύει το πρότυπο καρκινικών βλαστοκυττάρων, όπως ο καρκίνος του εγκεφάλου, του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του παγκρέατος και του προστάτικού αδένου.

Στόχος είναι να συνδυαστούν οι θεραπευτικές στρατηγικές που στοχοποιούν τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, με ανάλογες στρατηγικές που θα στοχοποιούν και τα βραδέως διαιρούμενα καρκινικά βλαστοκύτταρα και να τα οδηγήσουν σε κατευθυνόμενη νέκρωση. Μέσα στα επόμενα χρόνια, οι επιστήμονες ελπίζουν να ανακαλύψουν αν η θεωρία των CSCs είναι μια πραγματική επανάσταση για τη θεραπεία του καρκίνου ή εάν απαιτείται ένα πιο ακριβές μοντέλο.

Σύμφωνα με τα δεδομένα επισημαίνεται ότι και οι περισσότερες περιπτώσεις ΚΠΕ ξεκινούν με μετάλλαξη και αδρανοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του Adenomatous Polyposis Coli (APC), το οποίο στη συνέχεια συμβάλλει στην απορρύθμιση πολλών άλλων κυτταρικών διεργασιών. Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1 ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και σε καρκινικά κύτταρα παρατηρείται υπερέκφρασή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο κυτταρικός κύκλος να επιταχύνει τις διαδικασίες του. Ως εκ τούτου μια υψηλή συγκέντρωση E2F1 σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος του όγκου, τυχόν μετάσταση στους λεμφαδένες και προδιαγράφει την επιβίωση ασθενών με ΚΠΕ.

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αναλύοντας τη δράση του γονιδίου P14ARF στον ΚΠΕ, παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της μετάλλαξης του γονιδίου και της θέσης του όγκου, όπως επίσης και της κατάστασης της μικροδορυφορικής του αστάθειας. Πάραυτα το στάδιο του όγκου και η διαφοροποίησή του, δεν αποδεικνύεται μέχρι στιγμής να σχετίζεται με το γονίδιο P14ARF βάσει ερευνών στο εργαστήριο.

Αρκετές μελέτες πάνω στον ΚΠΕ αναφέρονται στην προγνωστική αξία της έκφρασης του γονιδίου K167. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αντικατοπτρίζει το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οπότε μπορεί και να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός δείκτης για την κατανόηση της επιθετικότητας του όγκου.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η σχέση των γονιδίων APC, E2F1 και P14ARF, σε ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί με ΚΠΕ. Βοήθεια σε αυτή την ανάλυση δίνει η ταυτόχρονη παρακολούθηση του γονιδίου K167. Οι ιστοί έχουν ληφθεί από ασθενείς κατόπιν συναίνεσής τους και σε δεύτερη φάση έχει πραγματοποιηθεί ανάλυσή τους στο εργαστήριο. Όλα τα στάδια έχουν ακολουθήσει τις προβλεπόμενες από τις εταιρείες αντιδραστηρίων, κατευθυντήριες οδηγίες.

Συνοψίζοντας μια έρευνα σχεδόν δέκα ετών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα προαναφερθέντα γονίδια εμφανίζουν μια σχέση όταν έχουμε να κάνουμε με ασθενή που παρουσιάζει ΚΠΕ. Πηγαίνοντας ανάποδα τη διαδικασία, αντιλαμβανόμαστε ότι μπορούν να έχουν σημαντική χρήση ως βιοδείκτες προκειμένου να εντοπίσουμε έγκαιρα τυχόν μεταλλάξεις. Γνωρίζοντας έτσι τη γενετική προδιάθεση, μπορεί ο άνθρωπος να χρησιμοποιήσει τη γνώση αυτή προς όφελός του, κάνοντας νωρίτερα απεικόνιση του παχέος εντέρου είτε προσέχοντας ιδιαίτερα τη διατροφή του. Θεραπείες που βρίσκονται υπό έρευνα έχουν να κάνουν με ανάπτυξη ενός εμβολίου ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου χρησιμοποιώντας εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα σε κέντρο ερευνών στην Washington. Την ίδια στιγμή το πανεπιστήμιο του Wisconsin προτείνει την ανάλυση τεσσάρων βιοδεικτών πρωτεϊνών, που συνδέονται με προκαρκινικές αλλοιώσεις στον ΚΠΕ, ως πιο αξιόπιστο και απλό εργαλείο αντί της χρήσης της κλασσικής κολονοσκόπησης.

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

(Με τη σειρά που εμφανίζονται στο κείμενο)

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ΚΠΕ: Καρκίνος Παχέος Εντέρου

ΚΚΚ: Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα

CSCs: Cancer Stem Cells (Νεοπλασματικά Βλαστοκύτταρα)

ΦΠΕ: Φλεγμονώδεις Παθήσεις Εντέρου

TNF: Tumor Necrosis Factors

IBD: Inflammatory Bowel Disease

ΟΑΠ: Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση

FAP: Familial Adenomatous Polyposis

ΕΚ: Ελκώδης Κολίτιδα

ΦΝΕ: Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου

CDKs: Cyclin Dependent Kinases Κύκλινο (Εξαρτώμενες Κινάσες)

ΟΜΛ: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Το APC (Adenomatous Polyposis Coli) είναι ένα ανθρώπινο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Σε μετάλλαξη του, εμφανίζεται Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση (ΟΑΠ) και σποραδικός Καρκίνος του Παχέου Εντέρου (ΚΠΕ). Οι μεταλλάξεις στο APC, λαμβάνουν χώρα στα αρχικά στάδια της ογκογενετικής διαδικασίας.

**Σκοπός:** Η διερεύνηση της σχέσης εμφάνισης ΚΠΕ και μετάλλαξης του APC, καθώς επίσης η σχέση του APC με τις E2F1, P14ARF και Ki67 πρωτεΐνες. Απώτερος στόχος είναι, μέσω εξέτασης αίματος για γονιδιακή μετάλλαξη, να διαπιστώνουμε και να προλαμβάνουμε την εμφάνιση ΚΠΕ.

**Μεθοδολογία:** Το δείγμα της μελέτης αποτέλεσαν νεοπλασματικοί ιστοί στους οποίους έγινε μονιμοποίηση, σε κύβους παραφίνης. Ακολούθησε ενυδάτωση τομών και ανάλυσή τους με τη μέθοδο της Ανοσοϊστοχημείας. Έπειτα αφυδάτωση ιστών και κλείσιμο σε πλακάκια. Τέλος έγινε αξιολόγηση και φωτογράφιση των ιστών. Τα δεδομένα αναλύθηκαν σε πίνακες μέσω του προγράμματος SPSS v20. Η εγκυρότητα των ιστολογικών αποτελεσμάτων συσχετίζεται με ταυτόχρονη μελέτη των γονιδίων E2F1, P14ARF, όπως και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

**Αποτελέσματα:** Η μέση ηλικία των συμμετεχόντων ήταν 67,27 με εύρος 34-90 έτη. Το 50% των συμμετεχόντων ήταν γυναίκες. Η πλειοψηφία των ασθενών (57,7%) δεν είχε κανένα εθισμό στον καπνό. Το 3,84% ήταν παχύσαρκοι και το 19,23% είχαν την τάση να καταναλώνουν αλκοόλ. Περίπου το 30,77% είχε τουλάχιστον ένα μέλος της οικογένειας με ιστορικό καρκίνου. Από τα 88 δείγματα ασθενών με νεοπλασία που συλλέχθηκαν, το 34% εμφάνισε κακοήθες νεόπλασμα ενώ το 28% των ασθενών πραγματοποίησε Ήμικολεκτομή Δεξιά. Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του γονιδίου APC κυμαίνεται από ασθενής (79,55%) έως πολύ ισχυρή (6,82%). Θετική έκφραση του P14ARF με ταυτόχρονη θετική έκφραση του APC εμφανίζεται στο (88,23%). Επιπλέον, ένα ποσοστό θετικής έκφρασης (64,7%) P14ARF, παρουσίασε ταυτόχρονη θετική έκφραση με τα γονίδια E2F1 και APC.

**Συμπεράσματα:** Τα δεδομένα της συγκεκριμένης έρευνας σηματοδοτούν πιθανή συσχέτιση μεταξύ του ΚΠΕ και της θετικής έκφρασης των γονιδίων APC, E2F1, P14ARF και Ki-67. Οι παραπάνω μεταλλάξεις στα δύο

αλληλόμορφα γονίδια APC, υποδηλώνουν ότι η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC είναι ένα πολύ κρίσιμο και πρώιμο φαινόμενο στην ογκογένεση του παχέος εντέρου. Η συσχέτιση αυτή μπορεί να συμβάλλει στην ανακάλυψη πιθανών διαγνωστικών δεικτών για την παρακολούθηση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου και εξέταση σε μικρότερη ηλικία για πρώιμα σημάδια Καρκίνου.

**Λέξεις- Κλειδιά:** Καρκίνος Παχέος Εντέρου, μετάλλαξη, APC, E2F1, P14ARF

## **SUMMARY**

**Purpose:** The purpose of this study is to determine the relationship between APC gene mutations and subcellular differentiation levels of E2F1, P14ARF and Ki67 proteins. Furthermore, if such connections can be used in the area of preventive health care.

**Materials and methods:** The 30 hours Immunohistochemistry protocol used, had samples preparation, antigen retrieval, background blocking, target detection and sample visualization. Samples were viewed and captured by light microscopy.

**Results:** The conducted research concern 88 patients with a range age of 56 years. 57,7% had no tobacco addiction, 3,84% were obese and 19,23% had the tendency to consume alcohol. About 31% had at least one family member with a history of cancer. Intensity and positivity of the genes vary as seen in tables.

**Conclusion:** By targeting specific and simultaneously multiple pathways based on molecular signatures, enables cases to be detected at an earlier stage, when there are greater chances of cure as treatment is more effective. A plan for early detection of cancer is a key component within an overall cancer control plan. An early diagnosis program is far cheaper and easier leading to appropriate treatments which finally reduce death rates and suffering due to cancer.

**Keywords:** APC, colorectal cancer, E2F1, P14ARF, Ki67

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (ΚΠΕ)

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

##### **1.1 Εισαγωγή**

Η νεοπλασματική νόσος αναφερόμενη και ως κακοήθης όγκος ή καρκίνος, είναι μια νοσογόνος κατάσταση η οποία έχει σχέση με την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη του κυττάρου, τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και την αποπτωτική διαδικασία. Υπάρχουν δύο κατηγορίες καρκίνου οι οποίες είναι ο καλοήθης και ο κακοήθης καρκίνος. Η διάκριση αυτών των δύο γίνεται σύμφωνα με τη δυνατότητα του καρκίνου στο να κάνει μεταστάσεις ή όχι. Ανάλογα, τώρα, με την βιολογική τους συμπεριφορά και τον ιστολογικό τύπο καθορίζεται αντίστοιχα η κατηγορία στην οποία ανήκουν. Η ορθή σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου, είναι ζωτικής σημασίας για τον σχεδιασμό της θεραπείας και την πρόβλεψη των ποσοστών επιβίωσης που έχει ο ασθενής<sup>1</sup>, ενώ το πιο κοινώς χρησιμοποιούμενο μοντέλο σταδιοποίησης είναι αυτό του Tumor Necrosis Factors (TNF)<sup>2</sup>.

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Αποτελεί την δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες, ενώ ο καρκίνος του παχέος εντέρου, είναι ο τρίτος πιο κοινώς διαγνωσμένος καρκίνος παγκοσμίως, μετρώντας το 10% των εκτιμώμενων 14,1 εκατομμυρίων νέων περιστατικών καρκίνου που καταγράφηκαν το 2018<sup>3</sup>. Επιπλέον, αποτελεί το τρίτο κυρίαρχο αίτιο θανάτου σχετιζόμενο με καρκίνο στις γυναίκες και το τέταρτο στους άντρες, με 693,600 θανάτους παγκοσμίως το 2018. Το ένα τρίτο του διαγνωσμένου με καρκίνο πληθυσμού το 2018 (περίπου 450,000 ασθενείς διαγνώστηκαν) αποτελούσαν καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε μελέτες βασισμένες σε ανθρώπους, οι αναλογίες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου στο II στάδιο και στο III είναι περίπου 40% και 30% αντίστοιχα<sup>4-6</sup>, με τα ποσοστά επιβίωσης σε αυτά τα στάδια να είναι 50-80% και 30-60% αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Kanth P. Et al, ο ΚΠΕ είναι ο τέταρτος συχνότερος καρκίνος μεταξύ ανδρών και γυναικών για το 2017. Περίπου το 3-

6%, όλων των ΚΠΕ αποδίδονται σε καλά καθορισμένα κληρονομικά σύνδρομα, συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου Lynch, της Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίασης (Familial Adenomatous Polyposis – FAP), της πολυποδίασης που σχετίζεται με το MUTYH (MUTYH–Associated Polyposis – MAP) και αρκετών άλλων. Η ταυτοποίηση αυτών των ασθενών μέσω του οικογενειακού ιστορικού και των κατάλληλων γενετικών εξετάσεων μπορεί να παρέχει εκτιμήσεις για τον κίνδυνο καρκίνου. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η σημαντικότητα του ενδεδειγμένου προσυμπτωματικού ελέγχου, παρακολούθησης και / ή προληπτικών παρεμβάσεων.

Την τελευταία δεκαετία, η επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό ΚΠΕ έχει βελτιωθεί πάρα πολύ. Αυτό έχει επιτευχθεί λόγω της εμφάνισης νέων φαρμάκων (ιρινοτεκάνη και οξαλιπλατίνη) και θεραπειών-στόχων (π.χ. bevacizumab, cetuximab, ranitumab, aflibercept και regorafenib), η διάμεση συνολική επιβίωση αυξήθηκε από τους 12 μήνες, που υπολογιζόταν περίπου στα μέσα της δεκαετίας του 1990, σε 30 μήνες.

Οι μοριακές μελέτες έχουν πρόσφατα διευρύνει την ευκαιρία για δοκιμή νέων πιθανών δεικτών, αλλά στην πραγματικότητα μόνο λίγοι δείκτες μπορούν να συνιστώνται για πρακτική χρήση στην κλινική. Στο άμεσο μέλλον, η ελπίδα είναι να υπάρχει μια πλήρη ομάδα κλινικών βιοδεικτών που θα χρησιμοποιείται σε κάθε ρύθμιση της νόσου ΚΠΕ, και ταυτόχρονα να λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την προγνωστική σημασία της έκφρασής τους και να προσανατολίζεται κατά αυτόν τον τρόπο η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.

Εξάλλου, το υπόβαθρο όλων των ΚΠΕ δεν είναι το ίδιο. Μεμονωμένοι ασθενείς, με όγκους ίδιας σταδιοποίησης μπορεί να έχουν διαφορετική μακροπρόθεσμη πρόγνωση και απόκριση στη θεραπεία. Επιπλέον, ορισμένες προγνωστικές μεταβλητές είναι πιθανό να είναι πιο σημαντικές από άλλες.

Η αιτία για την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου, δεν είναι μια. Η επιστημονική κοινότητα συνεχίζει ακόμα και σήμερα να ανακαλύπτει αιτίες τόσο περιβαλλοντικές όσο και γενετικές για την δημιουργία του ΚΠΕ. Στην παρούσα μελέτη θα γίνει προσπάθεια να αναλυθούν τα γονίδια APC, E2F1, P14ARF και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού KI-67.

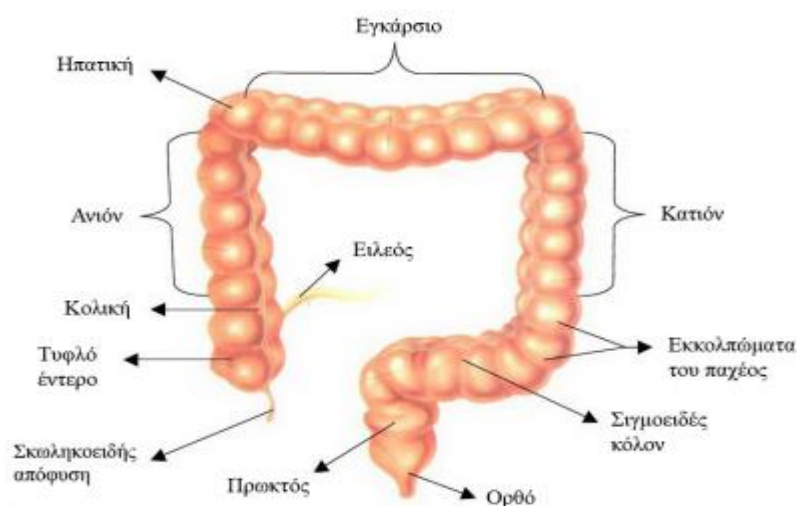
Παρά την σημαντική αύξηση της επιβίωσης κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, η 5ετης επιβίωση μετά την διάγνωση της νόσου είναι περίπου 59%<sup>7</sup>, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχουν πολλά ακόμα που δεν



γνωρίζουμε για τον ΚΠΕ, τόσο για την ανάπτυξη και εξέλιξη του, όσο και για την θεραπευτική του αντιμετώπιση.

## 1.2 Ανατομία Παχέος Εντέρου

Το παχύ έντερο εκτείνεται από τον τελικό ειλεό έως την οδοντωτή γραμμή, δηλαδή έως και τα 2cm εγγύς του πρωκτικού σωλήνα (Εικ. 1). Κατά την κλασική περιγραφή, τα μέρη του είναι: το τυφλό, το κόλον (ανιόν, εγκάρσιο, κατιόν, σιγμοειδές), το ορθό και ο πρωκτικός σωλήνας.



**Εικόνα 1:** Περιγραφή Ανατομικών Στοιχείων Παχέος Εντέρου.

Τα πρώτα 6 εκ. παχέος εντέρου, από την ειλεοτυφλική βαλβίδα, που αποτελούν το τυφλό, το ανιόν και την ηπατική καμπή απαρτίζουν ξεχωριστά μια χειρουργική μονάδα, το δεξιό κόλον (δεξιά κολεκτομή). Το άνω εγκάρσιο κόλον, η σπληνική καμπή, το κατιόν και το σιγμοειδές απαρτίζουν το αριστερό κόλον (αριστερή κολεκτομή). Η συμβολή σιγμοειδούς κόλου και ορθού ορίζεται με διάφορα σημεία που δεν είναι όμως σταθερά, και δεν υπάρχει και ουσιαστικός χειρουργικός λόγος για τον ακριβή καθορισμό της μεταπτώσεως αυτής. Ομοίως, το κατώτερο όριο του ορθού είναι ασαφώς οριζόμενο. Ο ανατομικός πρωκτικός σωλήνας ορίζεται ως το τμήμα του πεπτικού σωλήνα που βρίσκεται ουραία της οδοντωτής γραμμής. Ο χειρουργικός πρωκτικός σωλήνας περιλαμβάνει τον ανατομικό πρωκτικό σωλήνα και τα άνω 2 εκ. του ορθού, άνω της οδοντωτής γραμμής και παρουσιάζει ενιαία παθολογία. Στον ορθοπρωκτό

διακρίνονται το καθ' αυτό ορθό και ο ορθικός αυχέννας, που περιγράφεται ως το συνενωμένο από τους σφιγκτήρες τμήμα, το οποίο ισοδυναμεί με το χειρουργικό πρωκτικό σωλήνα. Ο χειρουργικός πρωκτικός σωλήνας έχει μήκος 4 εκ., το ορθό 12 εκ. και το σύνολο του ορθοπρωκτού 16 εκ.

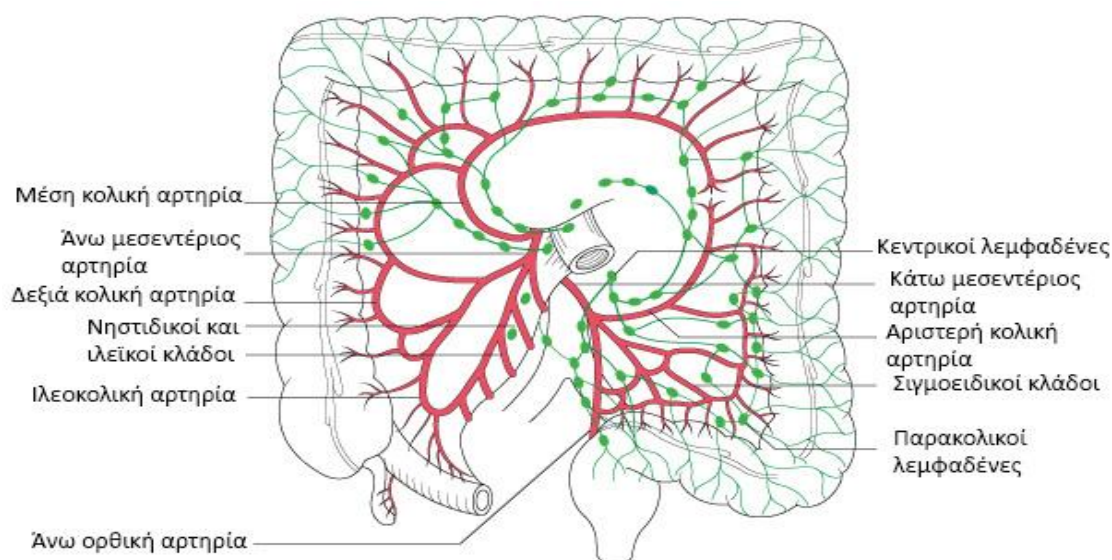
### **1.3 Αγγείωση**

#### **1.3.1 Αρτηρίες**

Τέσσερις είναι οι κύριες αρτηρίες που αγγειώνουν το παχύ έντερο. Η Άνω μεσεντέρια αρτηρία. Το τυφλό και το ανιόν αρδεύονται από δύο κλάδους της άνω μεσεντερίου αρτηρίας: την ειλεοκολική και τη δεξιά κολική. Οι αρτηρίες αυτές σχηματίζουν τόξα, από τα οποία ευθεία αγγεία πορεύονται προς το έσω χείλος του τοιχώματος του κόλου. Καθώς φτάνουν στην επιφάνεια του κόλου διαχωρίζονται σε βραχείς και μακρούς κλάδους. Οι βραχείς τροφοδοτούν το μεσεντερικό τμήμα του κόλου, κατά τα δύο τρίτα της περιφέρειάς του και οι μακροί το πλάγιο, το αντιμεσεντερικό τμήμα και τις επιπλοϊκές αποφύσεις. Το εγκάρσιο κόλο τροφοδοτείται από τη μέση κολική αρτηρία. Η σπληνική καμπή τροφοδοτείται στο 37% των ανθρώπων από τη μέση κολική αρτηρία, ενώ στο υπόλοιπο ποσοστό από την αριστερή κολική, κλάδο της κάτω μεσεντερίου αρτηρίας.

Η Κάτω μεσεντέρια αρτηρία. Οι κλάδοι της κάτω μεσεντερίου αρτηρίας είναι η αριστερή κολική με τον ανιόντα και τον κατιόντα κλάδο για το κατιόν κόλον, 1-9 σιγμοειδικές αρτηρίες για το σιγμοειδές κόλον και η άνω ορθική (αιμορροϊδική) για το ορθό. Σε 10% των ανθρώπων παρατηρείται επικουρική μέση κολική αρτηρία. Η αριστερή κολική φθάνει μέχρι το ύψος της σπληνικής καμπής (86%) ή ενώνεται με την επιχείλιο αρτηρία πλησίον της καμπής. Σε ολόκληρη την αγγείωση του κόλου, ο ανιόν κλάδος της αριστερής κολικής αποτελεί την πρωτεύουσα αρτηριακή παροχή (96%). Εάν η αρτηρία αυτή και οι παράπλευρές της κατά τη σπληνική καμπή είναι ανέπαφες, υπάρχει ικανή αιματική παροχή προς το εγγύς ανιόν κόλον μετά την κεντρική απολίνωση της μέσης κολικής και της δεξιάς κολικής.

Η επιχειλίου αρτηρία (του Drummond). Σχηματίζεται από μια σειρά αναστομωτικών τόξων μεταξύ κλάδων της ειλεοκολικής, δεξιάς κολικής, μέσης κολικής, αριστερής κολικής και των σιγμοειδικών αρτηριών. Η επιχειλίου αρτηρία είναι μονήρες αγγείο, το οποίο πορεύεται σχεδόν παράλληλα του μεσεντερικού χείλους του παχέος εντέρου, σε απόσταση 1-2 εκ. από το τοίχωμα. Περιφερικά, καταλήγει στην άνω ορθική αρτηρία (Εικ. 2).



**Εικόνα 2:** Αγγεία του Παχέος Εντέρου<sup>8</sup>.

Η Αρτηριακή παροχή ορθού. Οι αρτηρίες του ορθού και του πρωκτού είναι η άνω ορθική αρτηρία (αιμορροϊδική) που εκφύεται από την κάτω μεσεντέρια και κατέρχεται στο οπίσθιο τμήμα του ορθού. Τροφοδοτεί το οπίσθιο τοίχωμα και τα πλάγια τοιχώματα του άνω και μέσου τριτημορίου του ορθού μέχρι την οδοντωτή γραμμή, με δεξιούς και αριστερούς κλάδους. Η παρουσία των μέσων ορθικών αρτηριών είναι ασταθής. Κυμαίνονται από 3 έως 9, είναι κλάδοι της έσω λαγονίου αρτηρίας και διαφέρουν ως προς την έκφυσή τους. Πολλοί αναφέρουν το αγγείο που περιέχεται στους πλάγιους συνδέσμους ως επικουρική μέση ορθική αρτηρία και αναγνωρίζουν το αγγείο κάτω από τους πλάγιους συνδέσμους ως κύρια μέση ορθική αρτηρία. Η μέση ορθική αρτηρία απουσιάζει στο θήλυ. Οι κάτω ορθικές αρτηρίες εκφύονται από την έσω λαγονία αρτηρία και αρδεύουν τον πρωκτικό σωλήνα περιφερικά της οδοντωτής γραμμής. Η μέση ιερή αρτηρία, που εκφύεται κεντρικά του διχασμού της αορτής κατέρχεται στην πρόσθια επιφάνεια των κατώτερων οσφυϊκών σπονδύλων, δίνει πολλούς μικρούς κλάδους στο οπίσθιο τμήμα του ορθού.

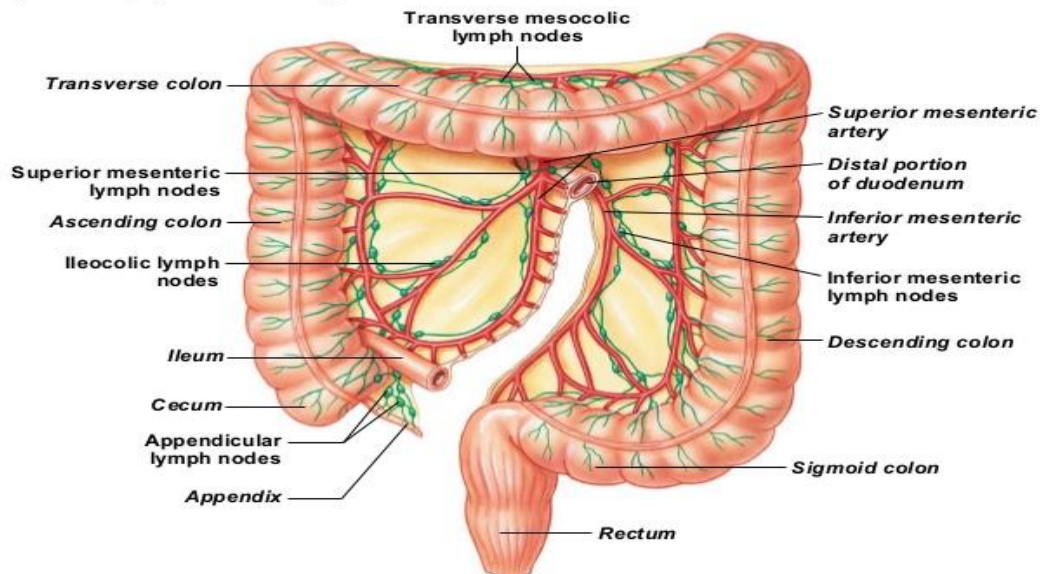
### 1.3.2 Φλέβες

Οι φλέβες του παχέος εντέρου ακολουθούν τις αρτηρίες. Στα δεξιά (τυφλό, ανιόν, δεξιό εγκάρσιο) οι φλέβες συμβάλλουν και σχηματίζουν την άνω μεσεντέρια φλέβα όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα (Εικ. 2). Η φλεβική αποχέτευση του αριστερού τμήματος του εγκαρσίου γίνεται προς την άνω μεσεντέρια φλέβα. Η άνω ορθική φλέβα αποχετεύει το κατιόν και το σιγμοειδές κόλο και συμβάλλει στο σχηματισμό της κάτω μεσεντερίου φλέβας. Το ορθό αποχετεύεται από τις άνω ορθικές φλέβες, οι οποίες εκβάλλουν στην κάτω μεσεντέρια και εν συνεχεία στη σπληνική φλέβα. Οι μέσες και κάτω ορθικές φλέβες εκβάλλουν στην έσω λαγόνιο, που υπάγεται στη συστηματική κυκλοφορία. Η κάτω ορθική φλέβα είναι υπεύθυνη για τη φλεβική αποχέτευση των κεντρικών 2 εκ του πρωκτού. Οι φυσιολογικές αναστομώσεις μεταξύ της άνω ορθικής φλέβας (πυλαία κυκλοφορία) και της μέσης και κάτω ορθικής φλέβας (συστηματική κυκλοφορία) συνιστούν σημαντική πυλαιοσυστηματική αναστόμωση.

### 1.3.3 Λεμφική Παροχέτευση

Οι λεμφαδένες του παχέος εντέρου διακρίνονται σε: επιπλοϊκούς ή επικολικούς (υπό τον ορογόνο του τοιχώματος του παχέος εντέρου), παρακολικούς (επί της επιχειλίου αρτηρίας), μεσοκολικούς ή ενδιάμεσους κατά μήκος των κυρίων αγγείων και κεντρικούς (στη ρίζα της άνω και κάτω μεσεντερίου αρτηρίας). Οι τελευταίοι περιλαμβάνουν τους λεμφαδένες της ρίζας του μεσεντερίου, οι οποίοι δέχονται λέμφο, από το λεπτό έντερο, τους αορτικούς και τους αριστερούς οσφυϊκούς λεμφαδένες. Παρ' ότι η λεμφική ροή ακολουθεί αντιστρόφως τις αρτηρίες, υπάρχουν βραχυκυκλωματικές συνδέσεις λεμφαγγείων, στο επίπεδο των αρτηριακών τόξων, παραλλήλως του παχέος εντέρου. Επιπλέον, υπάρχει επικοινωνία μεταξύ λεμφαγγείων εγκαρσίου κόλου και στομάχου, και μεταξύ λεμφαγγείων ανιόντος- κατιόντος κόλου και κοιλιακού τοιχώματος. Η ευρεία, ογκολογικώς ορθή εκτομή του παχέος εντέρου περιλαμβάνει όλο το τμήμα, το οποίο αρδεύεται από μια μείζονα αρτηρία και την πλειονότητα των αντιστοίχων λεμφαδένων.

Figure 23.15 Lymph Nodes in the Large Intestine and Associated Mesenteries



**Εικόνα 3:** Λεμφικό Σύστημα Παχέος Εντέρου<sup>9</sup>.

## 1.4 Παθήσεις Παχέος Εντέρου που Συσχετίζονται με ΚΠΕ

Με τον όρο προκαρκινικές καταστάσεις εννοούμε παθήσεις του παχέος εντέρου οι οποίες προδιαθέτουν το συγκεκριμένο άτομο στο οποίο υπάρχουν να αναπτύξει στο μέλλον καρκίνο παχέος εντέρου. Τέτοιες καταστάσεις είναι οι πολύποδες του παχέος εντέρου, η ελκώδης κολίτις και η νόσος του Crohn, το σύνδρομο οικογενούς καρκίνου του παχέος εντέρου (άτομα τα οποία εμφανίζουν καρκίνο παχέος εντέρου σε διαδοχικές γενεές).

### 1.4.1 Φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου

#### 1.4.1.1 Ελκώδης Κολίτιδα

Η Ελκώδης Κολίτιδα (ΕΚ) είναι μια μορφή Φλεγμονώδους Νόσου του Εντέρου (ΦΝΕ). Η ΦΝΕ συγγέεται συχνά με το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου, όπου το παχύ έντερο φλεγμαίνει και διογκώνεται με αποτέλεσμα να αδυνατεί να απορροφήσει το νερό που χρειάζεται. Η ΕΚ παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με τη νόσο του Crohn, μια άλλη ασθένεια του παχέος εντέρου. Παλαιότερα πίστευαν ότι επρόκειτο για την ίδια ασθένεια. Σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι δύο διαφορετικές ασθένειες που ανήκουν στις Ιδιοπαθείς ΦΝΕ και παρόλο που έχουν αρκετές ομοιότητες, έχουν και αρκετές διαφορές. Η σημαντικότερη διαφορά τους είναι ότι ενώ στην ΕΚ πάσχει μόνο το παχύ

έντερο, στη νόσο του Crohn μπορεί να υπάρχουν βλάβες και στο λεπτό έντερο, το στομάχι και στο στόμα. Πάνω από 70 χρόνια πριν, ο Began πρώτος έδειξε την σχέση μεταξύ ΕΚ και ΚΠΕ. Σε αυτήν την πρώτη μελέτη, οι πολυεστιακοί καρκίνοι που παρατηρήθηκαν βρέθηκαν να συνδυάζονται με πρώιμη έναρξη κολίτιδας<sup>10</sup>. Μεταγενέστερες μελέτες, έδειξαν αυξημένο κίνδυνο ΚΠΕ σε έδαφος χρόνιας ΕΚ<sup>11-14</sup>, τον οποίο πρώτος ο Crohn περιέγραψε το 1952<sup>15</sup>.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ είναι σε άμεση συνάρτηση του χρονικού διαστήματος που το άτομο πάσχει από ΦΝΕ καθώς και με τον βαθμό στον οποίο συμμετέχει το έντερο<sup>16</sup>. Ο ΚΠΕ ευθύνεται για το 10-15% των θανάτων ασθενών με ΦΝΕ [14] ενώ το 1-2% των ΚΠΕ αποτελούν εξέλιξη των ΦΝΕ<sup>17</sup>. Επιπλέον, τα ποσοστά θνησιμότητα για ασθενείς με ΚΠΕ είναι υψηλότερα μεταξύ ΚΠΕ σχετιζόμενων με ΦΝΕ σε σχέση με ΚΠΕ που σχετίζεται με άλλους παράγοντες κινδύνου<sup>18</sup>. Συμπερασματικά, αυτό υποδηλώνει μια άμεση σύνδεση μεταξύ του ΦΝΕ και του ΚΠΕ. Σύγχρονες τάσης της μοριακής παθολογίας συγκλίνουν στην ιδέα του καθορισμού του όγκου και στη συλλογή στοιχείων, που δείχνουν ότι οι ΚΠΕ που σχετίζονται με ΦΝΕ έχουν μια διαφορετική παθολογία από τους μη σχετιζόμενους με ΦΝΕ ΚΠΕ<sup>19,20</sup>.

#### **1.4.1.2 Νόσος του Crohn**

Η νόσος του Crohn ή κοκκιωματώδης κολίτιδα ή τοπική εντερίτιδα είναι μια ΦΝΕ άγνωστης αιτιολογίας, η οποία προκαλεί φλεγμονή του βλεννογόνου και δημιουργεί αλλοιώσεις σε όλο το τοίχωμα του εντέρου, οδηγώντας σε απειλητικές για τη ζωή επιπλοκές. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πήρε το όνομά της από τον Burrill Crohn, ο οποίος μαζί με τους συνεργάτες του το 1932 παρουσίασαν για πρώτη φορά την ασθένεια αυτή<sup>15</sup>. Στην πορεία, αρκετές ήταν η μελέτες οι οποίες ασχολήθηκαν με τον σχετικό κίνδυνο που παρουσίαζαν οι ασθενείς με νόσο του Crohn στην ανάπτυξη ΚΠΕ. Τα ερευνητικά αποτελέσματα των ερευνών αυτών όμως είναι διχασμένα. Μερικές μελέτες, ισχυρίζονται ότι ο κίνδυνος ενός ασθενούς ο οποίος πάσχει από Νόσο Crohn, να αναπτύξει ΚΠΕ είναι ίδιος ή στατιστικά μη σημαντικός με τον κίνδυνο του γενικού πληθυσμού στο να αναπτύξει ΚΠΕ<sup>11,21-23</sup>. Οι Lutgens et al. το 2008 παρουσίασαν τα αποτελέσματα της μετα- ανάλυσης που έκαναν, και διαπίστωσαν ότι το

ποσοστό κινδύνου για ανάπτυξη ΚΠΕ αυξάνεται αθροιστικά σε περιβάλλον χρόνιας έκθεσης στην νόσο του Crohn και σε ΕΚ<sup>24</sup>. Στα ίδια αποτελέσματα οδηγήθηκαν και άλλες μελέτες, οι οποίες όμως διαπίστωσαν και μια διαφορετική παθοφυσιολογία του ΚΠΕ όταν υπάρχει ιστορικό χρόνιας ασθένειας Crohn<sup>25-29</sup>.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ, κατά την εξέλιξη ΕΚ ή νόσου του Crohn είναι σημαντικά αυξημένος, ειδικά σε ασθενείς οι οποίοι έχουν εκτεθεί χρόνια ή σε εκείνους που πάσχουν από αυτές τις ασθένειες για 8 με 10 χρόνια, καταλήγουν οι περισσότερες έρευνες και μετα- αναλύσεις που έχουν γίνει πάνω στο θέμα. Το γεγονός αυτό, πιθανολογείται ότι οφείλεται στην αλλαγή της βιοποικιλότητας του εντέρου. Οι επιστήμονες όμως, δεν μπορούν να αποκλείσουν την επίδραση εξωτερικών παραγόντων, στην εξέλιξη των ΦΠΕ σε ΚΠΕ<sup>17</sup>.

#### **1.4.2 Κληρονομικά Σύνδρομα**

Ο ΚΠΕ σε ποσοστό της τάξης του 30%, έχει βρεθεί ότι οφείλεται σε κληρονομικά σύνδρομα ή υπήρχε εμφάνιση της νόσου σε οικογενειακό πρόσωπο<sup>30-32</sup> ενώ το 2-5% των ΚΠΕ αναπτύσσεται μετά από κληρονομικά σύνδρομα παχέος εντέρου<sup>33</sup>. Διάφορα κληρονομικά σύνδρομα αυξάνουν τον κίνδυνο για ΚΠΕ περισσότερο ή λιγότερο ειδικά, περιλαμβανομένων της ΟΑΠ, του κληρονομικού μη- πολυποδικού ΚΠΕ, του συνδρόμου Peutz-Jeghers, της νόσου Cowden's και υπερπλαστικής πολυποδίασης. Όλα αυτά τα σύνδρομα έχουν κληρονομική βάση, με αυτοσωμικό επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας, εκτός από την υπερπλαστική πολυποδίαση η οποία είναι σπάνια κληρονομική. Από τα υπόλοιπα σύνδρομα που αναφέρθηκαν, η διαφοροδιάγνωση είναι δύσκολη, καθώς σχετίζονται με ποικίλα αδενώματα και οι φαινότυποί τους δεν διαφέρουν σημαντικά. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν κλινικές ομοιότητες μεταξύ των συνδρόμων αυτών, ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ μετά από καθένα από αυτά τα σύνδρομα, καθώς επίσης και οι γενετικές αιτιολογίες τους είναι διαφορετικές<sup>33</sup>.

## Lynch Σύνδρομο

Τα άτομα που πάσχουν από αυτό το σύνδρομο, έχουν την προδιάθεση για διάφορους τύπους καρκίνων, ιδιαίτερα του παχέος εντέρου και του ενδομητρίου<sup>34</sup>. Το σύνδρομο αυτό, υπολογίζεται ότι προκαλεί το 2-4% όλων των ΚΠΕ<sup>35</sup>. Παρόλο που προσβεβλημένα άτομα μπορούν να αναπτύξουν αδενώματα του παχέος εντέρου με μεγαλύτερη συχνότητα από τον γενικό πληθυσμό, η πολυποδίαση είναι σπάνια. Όμως, ο κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ εκτιμάται ότι είναι 50-80%<sup>36</sup>.

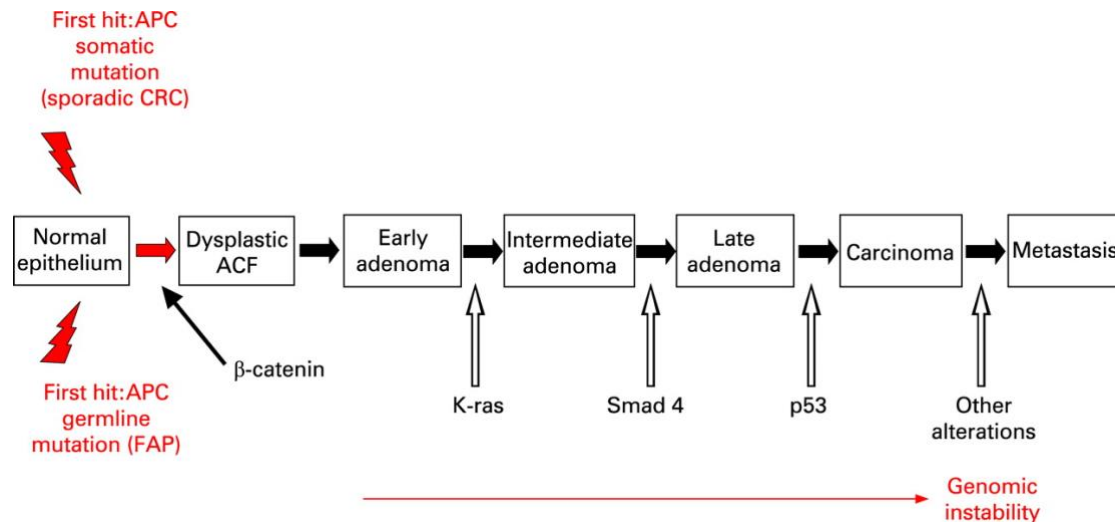
Ο ΚΠΕ και οι πολύποδες, εμφανίζονται στο σύνδρομο Lynch σε νεότερη ηλικία και σε διαφορετικά σημεία από ότι ο σποραδικός καρκίνος. Ιστολογικά, οι καρκίνοι έχουν μικρές διαφορές μεταξύ τους ενώ εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στα ογκο-διηθητικά λεμφοκύτταρα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την σταθερότητα της μεμβράνης των κυττάρων αυτών και των γονιδίων επιδιόρθωσης που έχουν υποστεί βλάβη, παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα και στην πρόγνωση τους<sup>37</sup>.

## Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση

Η ΟΑΠ είναι το δεύτερο πιο συχνά εμφανιζόμενο κληρονομικό σύνδρομο στον ΚΠΕ, με 1 στους 10,000 πάσχοντες. Η έναρξη του συνδρόμου πραγματοποιείται με την εμφάνιση μετά από πολυάριθμη εμφάνιση αδενωμάτων του παχέος εντέρου σε νεαρή ηλικία, και οδηγεί σε ΚΠΕ σε περίπτωση μη θεραπείας του. Σε περίπτωση μη θεραπείας, η διάγνωση ΚΠΕ σε ηλικία έως 21 ετών είναι 7% ενώ σε ηλικία 50 ετών ανεβαίνει κατακόρυφα στο ποσοστό των 95%. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ μετά από διάγνωση ΟΑΠ, είναι 69% κατά μέσο όρο, σε μεταγενέστερη ηλικία<sup>38</sup>.

Όλα τα σύνδρομα που προκύπτουν από αυτήν την οικογένεια συνδρόμων (όπως για παράδειγμα το σύνδρομο Gardner, ΟΑΠ με επιδερμικές κύστης, οστεόματα, οδοντικές ανωμαλίες) προκύπτουν από μετάλλαξη των βλαστικών σειρών στο APC<sup>39-43</sup>. Το γονίδιο APC, εκτός του ότι εμφανίζει κληρονομούμενες μεταλλάξεις στην ΟΑΠ, είναι και ένα από τα πλέον συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στο σποραδικό ΚΠΕ.





**Εικόνα 4:** Παράδειγμα καρκινογένεσης σποραδικού ΚΠΕ ή κληρονομούμενου μη πολυποδισιακού ΚΠΕ.

## MUTYH- Εξαρτώμενη Πολυποδίαση

Το MUTYH (mutY Homolog (E.Coli)) αποτελεί ένα ανθρώπινο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση της οξειδωτικής βλάβης του DNA. Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο, συσχετίζεται με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο του παχέος εντέρου και του στομάχου<sup>44</sup>. Συγκεκριμένα για το παχύ έντερο, προκαλεί αυτοσωμική υπολειπόμενη MUTYH-εξαρτώμενη πολυποδίαση. Οι πολύποδες που προκύπτουν από την μετάλλαξη αυτή, δεν εκδηλώνονται νωρίτερα από την ενηλικίωση του ασθενούς, ενώ δεν είναι περισσότερες σε συχνότητα από αυτές που προκύπτουν από μεταλλάξεις του APC γονιδίου<sup>45</sup>.

Η πολυποδίαση του παχέος εντέρου συνήθως συμβαίνει μετά τα 40 χρόνια ζωής, αν και πολύποδες και ΚΠΕ έχει εμφανιστεί και σε μικρότερη ηλικία. Μεταλλάξεις όμως σε αυτό το γονίδιο, έχουν βρεθεί σε άτομα με πρώιμη έναρξη ΚΠΕ οι οποίοι είτε έχουν λίγους, είτε δεν έχουν καθόλου πολύποδες<sup>46</sup>.

### 1.5 Αίτια ΚΠΕ

Ο καρκίνος είναι μια πάθηση που χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των κυττάρων. Εξαιτίας αυτών των μεταλλάξεων τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να

σχηματίζουν όγκους. Ο καρκίνος ξεκινάει όταν ένα κύτταρο υποστεί μια μετάλλαξη και στη συνέχεια αρχίζει να πολλαπλασιάζεται. Το κύτταρο αυτό, με την σειρά του, μαζί με τα θυγατρικά του κύτταρα, επειδή πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, δημιουργούν μια μάζα κυττάρων που ονομάζεται υπερπλασία. Μια επόμενη μετάλλαξη θα επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και θα προκαλέσει αλλαγές στη μορφολογία τους οδηγώντας έτσι σε δυσπλασία. Μια τρίτη μετάλλαξη, σε ένα από τα κύτταρα θα οδηγήσει σε ανώμαλη αύξηση και σε σχηματισμό *in situ* καρκινώματος. Αν τα κύτταρα μεταλλαχθούν επιπλέον, και αποκτήσουν την ικανότητα της διείσδυσης σε υποκείμενους ιστούς, ο όγκος χαρακτηρίζεται κακοήθης.

Επιγραμματικά, έξι είναι οι βασικές αλλαγές στην φυσιολογία του κυττάρου που οδηγούν στην ανάπτυξη ενός καρκίνου. Αυτές είναι η ικανότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, η αυτό-επάρκεια σε μηνύματα αυξητικών παραγόντων, η απώλεια απόκρισης σε αντιμιτογόνα μηνύματα, η αντίσταση στην απόπτωση, η ικανότητα επαγωγής αγγειογένεσης και τέλος η απόκτηση της ικανότητας διείσδυσης και μετάστασης.

Ανωμαλίες των ογκογονιδίων, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και των γονιδίων MMR (γονίδιο επιδιόρθωσης άστοχου ζευγαρώματος), APC<sup>45,47-49</sup>, HNPCC<sup>50</sup>, αποτελούν τη βάση της ογκογένεσης του ΚΠΕ. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια APC και MMR αποτελούν γενετικές μεταλλάξεις οι οποίες ευθύνονται για την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση ενώ το HNPCC ευθύνεται για το σύνδρομο Lynch. Άλλες μεταλλάξεις που οδηγούν σε σποραδικές καρκινικές νόσους παχέος εντέρου-ορθού, είναι μεταλλάξεις σε ογκογονίδια (όπως γονίδια *myc*<sup>51,52</sup>, *ras*<sup>49</sup>, *src*<sup>53-55</sup>, *erbB2*<sup>56,57</sup>) ογκοκατασταλτικά γονίδια (όπως γονίδια *p53*, *DCC*, *APC*) και γονίδια MMR (όπως τα γονίδια *hMSH2*<sup>58</sup>, *hMLH1*<sup>58</sup>, *hPMS1*<sup>59</sup>, *hPMS2*<sup>59</sup>, *hMSH6* και *hMSH3*<sup>60</sup>).

## **1.6 Εξωγενείς Παράγοντες Κινδύνου**

### **1.6.1 Περιβάλλον**

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες αποτελούν έναν ακόμη παράγοντα, ο οποίος πολλές φορές, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου<sup>61</sup>. Ο ατμοσφαιρικός αέρας, η ακτινοβολία που δεχόμαστε από

τον ήλιο, το φυσικό περιβάλλον διαβίωσης, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από διάφορες συσκευές μέχρι και τα υλικά κατασκευής αντικειμένων που χρησιμοποιούμε στην καθημερινότητά μας επηρεάζουν την εμφάνιση και την εξέλιξη του ΚΠΕ.

Λίγα είναι γνωστά για τις επιπτώσεις των γεωγραφικών παραγόντων, όπως η διαβίωση σε αγροτική και σε αστική κατοικία, στον ΚΠΕ. Μόνο μια μελέτη βρέθηκε, κατά την οποία αναφέρεται ότι οι ασθενείς που διαβιούν σε αγροτικές περιοχές, έχουν μειωμένη προσβασιμότητα στα διαγνωστικά κέντρα για έλεγχο του ΚΠΕ<sup>62</sup>, ενώ άλλες δύο μελέτες αναφέρουν ότι ο επανέλεγχος για τον ΚΠΕ σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό που διαμένουν μακριά από εξειδικευμένα κέντρα, είναι μικρότερης συχνότητας<sup>62,63</sup>. Η έλλειψη μελετών από την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα, δείχνει και την δυσκολία στην μελέτη και απομόνωση συγκεκριμένων παραγόντων, που πιθανόν να επηρεάσουν την ανάπτυξη ΚΠΕ.

Για την ηλιακή ακτινοβολία (UVA, UVB κλπ) δεν υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα για την άμεση σύνδεσή της με τον ΚΠΕ. Υπάρχουν όμως μελέτες, που έχουν γίνει για τον καρκίνο του δέρματος, οι οποίες αναφέρουν ότι η ακτινοβολία αυτή, ενεργοποιεί καρκινικά μονοπάτια, μέσω οξειδωτικού στρες που δημιουργείται στα κύτταρα που έχουν δεχθεί UVB ακτινοβολία, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη του ΚΠΕ μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης JNK που είναι υπεύθυνη για την φωτογύραση<sup>64-66</sup>.

Ηλεκτρικές συσκευές, καθώς και συσκευές κινητής τηλεφωνίας, αν και πολλές φορές ακούγονται διιστάμενες απόψεις, δεν υπάρχουν ερευνητικές μελέτες που να υποστηρίζουν πειραματικά την κακή ή την καλή τους επίδραση. Από την άλλη όμως, τα μικροκύματα, παρουσιάζουν θεραπευτικές ιδιότητες στον ΚΠΕ<sup>67</sup>. Η χρήση μικροκυμάτων στην ιατρική επιστήμη, στοχεύει στην κατάλυση όγκων μέσω θερμικής εκτομής του όγκου, με την υποστήριξη απεικονιστικής μεθόδου ραδιοσυχνότητας, το οποίο χρησιμοποιεί συχνότητες από 915 MHz - 2450 MHz<sup>68-70</sup>. Εύκολα γίνεται αντιληπτό, ότι οι συχνότητες που χρησιμοποιούνται για ιατρικούς σκοπούς είναι πολύ μικρότερες αυτών ενός φούρνου. Συνοπτικά για τις παραπάνω τρεις παραγράφους, παρά την έλλειψη ερευνητικής τεκμηριωμένης άποψης για την επίδραση αυτών των ακτινοβολιών στον άνθρωπο, μπορούμε να διαπιστώσουμε από τους νόμους της φυσικής, ότι μια ακτινοβολία γίνεται επικίνδυνη για τον ανθρώπινο οργανισμό, όταν οι

συχνότητές τους είναι υψηλές (για παράδειγμα ακτινοβολία Χ, γ, υπεριώδης κλπ) λόγω της ικανότητάς τους να ιονίσουν το DNA (να διασπάσουν χημικούς δεσμούς), προκαλώντας με τον τρόπο αυτό σημαντικές βλάβες και μεταλλάξεις<sup>71</sup>.

Ορισμένα υλικά κατασκευής τόσο αντικειμένων όσο και κτηρίων, έχουν κατηγορηθεί για ποικίλες επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό μετά από χρόνια έκθεσή του σε αυτά. Ένα από τα υλικά αυτά αποτελεί ο αμιάντος<sup>72</sup>. Ο Selikoff et al αναφέρει ότι μεταξύ των 632 εργαζόμενων χριστών με μέτρια ως βαριά έκθεση στο αμιάντο, εμφανίστηκε τριπλάσιος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος, μεταξύ αυτών και ο ΚΠΕ<sup>73,74</sup>. Πέραν των κτηρίων που είχαν κατασκευαστεί με αμιάντο, αρκετά συστήματα ύδρευσης σε πόλεις κυρίως επαρχιακές της χώρας, είναι κατασκευασμένα με αυτό το υλικό. Σε μελέτες επίσης, αναφέρεται η επίδραση του αμιάντου που υπάρχει στους σωλήνες ύδρευσης και καταναλώνεται από τους πολίτες μέσω του πόσιμου νερού, στους διάφορους καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος<sup>75,76</sup>. Μετά από τις έρευνες αυτές, πραγματοποιήθηκε μια περιβαλλοντική εκστρατεία κατά της χρήσης του αμιάντου σε ευρείας χρήσεως αντικείμενα και κτήρια<sup>77</sup>.

Άλλο ένα υλικό που έχει κατηγορηθεί για την τοξική του δράση και χρησιμοποιούνταν στην κατασκευή πλαστικών ειδών, στα οδοντικά σφραγίσματα και στα κουτιά κονσερβών, μπουκάλια νερών και μπιμπερό είναι το BPA (Δισφαινόλη Α)<sup>78</sup>. Πρόκειται για ένα οργανικό συνθετικό χημικό στοιχείο, το οποίο έχει την τάση να συμπεριφέρεται ως ορμόνη στον ανθρώπινο οργανισμό, η οποία αυξάνει την ανησυχία για την καταλληλότητά του σε ορισμένα καταναλωτικά προϊόντα<sup>79</sup>. Στην πρόσφατη μελέτη των Chen ZJ et al, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της έκθεσης καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA<sup>79</sup>. Στην μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι περισσότερες από 56 πρωτεΐνες διαφοροποιήθηκαν μετά την έκθεση στη δισφαινόλη Α. Οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονταν με την δομή, την κινητικότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την παραγωγή ATP, το οξειδωτικό στρες και τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Επιπλέον μελέτες αποκάλυψαν ότι η δισφαινόλη Α, αυξάνει την μετάσταση και την εισβολή και ενεργοποιεί τον μετασχηματισμό από επιθηλιακό σε μεσεκχυματικό κολοορθικό καρκινικό

κύτταρο, αυξάνοντας παράλληλα την έκφραση της N-κατενίνης με ταυτόχρονη μείωση της E-καδερίνης<sup>79-83</sup>.

Σε μελέτη κοόρτης που πραγματοποιήθηκε σε περιοχή της Γαλλίας, η οποία επέβλεπε την υγεία των εργαζομένων, επαγγελματικά εκτιθέμενων σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες, δεν διαπίστωσε σημαντική διαφορά θνησιμότητας λόγω καρκίνου σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό στην Γαλλία<sup>84</sup>.

### 1.6.2 Διατροφή

Πολλές ασθένειες στον ανθρώπινο οργανισμό είναι, είτε απόρροια διατροφικών συνηθειών, είτε ενισχύονται από τις κακές διατροφικές συνήθειες. Ο ΚΠΕ, αποτελεί μια νόσο η οποία έχει συσχετιστεί πολύ συχνά με τη διατροφική καθημερινότητα των ασθενών στους οποίους εμφανίζεται. Συγκεκριμένα επιδημιολογικά δεδομένα προτείνουν ότι, λήψη αυξημένων ποσοστών κόκκινου κρέατος και αλκοόλ αυξάνουν τον κίνδυνο, ενώ η σωματική άσκηση και η λήψη τροφών πλούσιων σε φυτικές ίνες μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ<sup>85</sup>.

Άλλες κατηγορίες τροφών, όπως είναι οι ξηροί καρποί, έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τον οργανισμό ενάντια σε αρκετές χρόνιες παθήσεις λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης τους σε συγκεκριμένες πολυφαινόλες<sup>86</sup>. Πιο συγκεκριμένες τροφές αυτής της κατηγορίας που έχουν μελετηθεί σε σχέση με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, είναι τα φουντούκια<sup>87</sup>, το ginseng<sup>88</sup> καθώς και τα αμύγδαλα που περιέχουν την B17 βιταμίνη<sup>89</sup> (αλλιώς αμυγδαλίνη, παρουσιάζει αντικαρκινική δράση, μέσω της ρύθμισης των γονιδίων που σχετίζονται με τον κύκλο του κυττάρου σε ανθρώπινα κύτταρα ΚΠΕ<sup>90</sup>). Οι ξηροί καρποί εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και υπολιπιδαιμική δράση<sup>91,92</sup> ενώ ταυτόχρονα εμφανίζουν την ικανότητα να ρυθμίζουν το σωματικό λίπος<sup>88</sup>.

Σε μελέτες σχετικά με τους ξηρούς καρπούς, που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους, παρουσιάστηκε σημαντική συμβολή τους στην μείωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης του αίματος<sup>93-95</sup>, των τριγλυκεριδίων<sup>95</sup>, ενώ παράλληλα αύξησε τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης<sup>93-95</sup>. Παράλληλα, διαπιστώθηκε βελτίωση φλεγμονής<sup>96</sup>, της ενδοθηλιακής λειτουργίας<sup>95</sup> και της ευαισθησίας της ινσουλίνης<sup>96</sup>. Έχει διαπιστωθεί ότι τα προϊόντα οξείδωσης της χοληστερόλης, που ονομάζονται οξυστερόλες, είναι πιο δραστήρια από τη μη

οξειδωμένη χοληστερόλη, και προκαλούν προφλεγμονώδη και κυτταροτοξικά αποτελέσματα σε έναν αριθμό κυττάρων και ιστών<sup>97-99</sup>. Έχουν μάλιστα συσχετιστεί με παρεμβάσεις στην ομοίωση του βλεννογόνου του εντερικού επιθηλίου. Προκαλούν και διατηρούν μη αναστρέψιμες βλάβες του βλεννογόνου, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης ΚΠΕ<sup>100-104</sup>.

Η διατροφή με χαμηλά λιπαρά, καθώς και πλούσια σε βιταμίνη Β6, διαπιστώθηκε από έρευνες που έγιναν σε ποντίκια, που έπασχαν από ΚΠΕ, ότι έχει ευεργετικές ιδιότητες<sup>105</sup>. Οι ερευνητές, μελέτησαν το ποσοστό του λιθοχολικού οξέος, δεσοξυχολικού οξέος και τα δευτερογενή χολικά οξέα στα κόπρανα (στοιχεία που αποτελούν δείκτες ΚΠΕ). Διαπίστωσαν ότι ο λόγος λιθοχολικού οξέος/δεσοξυχολικού οξέος, μειώθηκε στα ποντίκια, που η διατροφή τους ήταν πλούσια σε ξηρούς καρπούς, και κυρίως στα ποντίκια που έπαιρναν και συμπληρωματική βιταμίνη Β6. Επίσης, ο λόγος πρωτογενών χολικών οξέων προς τα δευτερογενή χολικά οξέα, επίσης δείκτες ύπαρξης ΚΠΕ, μειώθηκε μετά την διατροφή με χαμηλά λιπαρά και ξηρούς καρπούς, γεγονός που υποστηρίζεται και από άλλες μελέτες<sup>105-108</sup>. Στην αντίθετη πλευρά, διατροφή που είναι πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, έχει διαπιστωθεί ότι μακροπρόθεσμα, προκαλεί βλάβες στο ενδοθήλιο του παχέος εντέρου, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση<sup>109-111</sup>.

Η Μεσογειακή Διατροφή είναι αναγνωρισμένη ως το διατροφικό μοντέλο με τον δυνατότερο συσχετισμό θωράκισης του οργανισμού κατά πολλών παθήσεων. Έχει αποτελέσει για πολλά χρόνια, αντικείμενο μελέτης, διατροφολόγων, οι οποίοι έχουν συσχετίσει το μοντέλο αυτό διατροφής με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιολογικών παθήσεων, χρόνιων παθήσεων και καρκίνων<sup>112</sup>. Ο μηχανισμός μέσα από τον οποίο η Μεσογειακή Διατροφή προάγει την υγεία, σχετίζεται λόγω της αυξημένης περιεκτικότητάς της σε ωμέγα λιπαρά<sup>113-117</sup>, (κυρίως από ψάρια), αντιοξειδωτικά, ελαιόλαδο, μέτρια λήψη αλκοόλ και φυσική άσκηση<sup>118</sup>.

Απόρροια της κακής διατροφής, εκτός από παθήσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση, οι καρδιοπνευμονικές παθήσεις, η υπερχοληστερολαιμία, αποτελεί και η κακοήθης παχυσαρκία<sup>119-121</sup>. Επιδημιολογικές μελέτες, αποδεικνύουν ότι δίαιτα μεγάλης περιεκτικότητας σε λίπη, προάγει τον ΚΠΕ<sup>122-130</sup>. Η κλασική άποψη με την οποία το υπερβολικό βάρος-παχυσαρκία σχετίζεται με τον καρκίνο<sup>111-131</sup>, καρκίνο του μαστού<sup>132,133</sup>,

του ενδομητρίου<sup>131,134-135</sup>, του οισοφάγου<sup>131, 136-139</sup>, του παχέος εντέρου<sup>131,140-142</sup>, των νεφρών<sup>131,143,144</sup>, θεωρεί τον λιπώδη ιστό ως ενεργό και μεταβολικό «όργανο»<sup>145</sup>, ενεργώντας μέσα από ενδοκρινείς, αυτοκρινείς και παρακρινείς διαδικασίες. Κατά συνέπεια, η γένεση και η εξέλιξη του καρκίνου δύναται να προκληθεί από διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολών στη σύνθεση και τη βιοδιαθεσιμότητα των ορμονών του φύλου, την αντίσταση στην ινσουλίνη, την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων και τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες<sup>146</sup>. Έχει διαπιστωθεί ότι, ο λιπώδης ιστός δρα ως δεξαμενή λιπόφιλων περιβαλλοντικών καρκινογόνων παραγόντων<sup>147</sup>. Ακριβέστερα, πολλές καρκινογόνες ουσίες, είναι μεταλλαξιογόνες ή προαγωγοί, όπου μπορούν να αποθηκευτούν στον λιπώδη ιστό, να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και επομένως, στοχεύοντας σε περιφερικούς ιστούς, επάγουν την καρκινογένεση<sup>146,148</sup>.

Το Αρσενικό, αποτελεί ουσία που απαντάται συχνά στα τρόφιμα και στο νερό<sup>149,150</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι βλάβες του δέρματος που σχετίζονται με το Αρσενικό, είναι πολύ διαφορετικές, όταν η δίαιτα που ακολουθήθηκε ήταν πλούσια σε λαχανικά, σε σύγκριση με δίαιτα πλούσια σε κρέας<sup>151,152</sup>. Επιπρόσθετα, το εντοπιζόμενο στα ούρα Αρσενικό που προήρθε από την κατανάλωση τροφής, φαίνεται να εξαρτάται από τη σύνθεση της διατροφής<sup>153,154</sup>. Δηλαδή, η σύνθεση της διατροφής μπορεί να επηρεάσει τόσο τη βιοδιαθεσιμότητα του Αρσενικού, όσο και την μορφή του Αρσενικού στο σώμα<sup>155-157</sup>. Δίαιτες πλούσιες σε πρωτεΐνες και λίπη, διαπιστώθηκαν ότι αυξάνουν τα επίπεδα των επικίνδυνων ειδών αρσενικού στο σώμα, σε σύγκριση με δίαιτες πλούσιες σε λαχανικά και φυτικές ίνες, με αποτέλεσμα, η πρώτη μορφή δίαιτας να οδηγεί συχνότερα σε μονοπάτια καρκινογένεσης στο παχύ έντερο<sup>154,158</sup>. Παρά το γεγονός ότι είναι δύσκολο να μελετηθεί αποκλειστικά μόνο ένα είδος τροφής, κάθε φορά σε σχέση με τον ΚΠΕ, λόγω του τρόπου ζωής, όσο αναφορά την διατροφή (κατανάλωση αλκοόλ, φρούτων, κόκκινων κρεάτων κλπ), είναι ευρέως αποδεκτό από επιδημιολογικές μελέτες κυρίως, ότι η διατροφή πλούσια σε λιπαρά οξέα ενισχύει την ανάπτυξη του ΚΠΕ<sup>159</sup>.

Τα φυτοφάρμακα και τα εντομοκτόνα, είναι άλλη μια μεγάλη κατηγορία τοξικών ουσιών που λαμβάνονται μέσω της τροφής. Συγκεκριμένα στοιχεία των φυτοφαρμάκων (όπως για παράδειγμα Maneb, Mancozeb, Zineb και πολλά

άλλα), έχουν μελετηθεί για τις επιπτώσεις που έχουν σε διάφορα κύτταρα *in vitro*. Αξίζει να αναφερθεί ότι η χημική ουσία Maneb προκαλεί Παρκινσονισμό<sup>160</sup>, καθώς χάνεται ο έλεγχος ντοπαμινεργικών και GABA ενεργικών νευρώνων<sup>161-166</sup>. Η Mancozeb σε χρόνια έκθεση, προκαλεί θυρεοειδισμό και ανοσορυθμιστικές επιπτώσεις στους εργαζόμενους στην γεωργία<sup>167,168</sup>, ενώ το Zineb έχει δειχθεί ότι μειώνει την γονιμότητα, και προκαλεί αναστολή μιτοχονδριακής λειτουργίας σε *in vitro* μελέτες<sup>162-164,169-174</sup>, αυξάνοντας την λειτουργία των μηχανισμών του στρες<sup>175-179</sup>. Όλες αυτές οι ουσίες μέσω των μηχανισμών που αναφέρθηκαν περιληπτικά, έχουν την ικανότητα να επάγουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες και αυξήσεις ανταλλαγής γονιδίων στην αδελφή χρωματίνη, ενώ παράλληλα προκαλούν καθυστέρηση στον χρόνο του κυτταρικού κύκλου σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα<sup>180</sup>. Η συσσώρευση των μεταλλικών στοιχείων των ουσιών των φυτοφαρμάκων και η ικανότητα αυτών των παραγόντων να προκαλέσουν υπεροξειδωση των λιπιδίων, ερευνήθηκαν επίσης ως πιθανοί μηχανισμοί για την υποκείμενη τοξικότητά τους. Σε *in vitro* μελέτες σε υγιή κύτταρα παχέος εντέρου, διαπιστώθηκε ότι ύστερα από έκθεση σε παράγοντες που περιέχουν τα φυτοφάρμακα και είναι τοξικοί, μειώνεται η κυτταρική βιωσιμότητα<sup>181</sup>.

### 1.6.3 Ιοί

Οι ιοί και τα βακτήρια με ογκολυτικές ιδιότητες, καθώς και η τροποποίηση και χρήση τους ως θεραπευτικοί παράγοντες, αποτελεί μια νέα ερευνητική πρόκληση και ενεργός τομέας έρευνας<sup>182-184</sup>. Υπάρχει η άποψη ότι η έκθεση σε ορισμένους κοινούς λοιμογόνους παράγοντες μπορεί να μειώσει την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου, καταστρέφοντας τον καρκίνο πριν ανιχνευθεί ή να οδηγήσει τον ίδιο τον οργανισμό να το πράξει<sup>185</sup>. Η βελτίωση της δημόσιας υγείας και υγιεινής έχει μειώσει την έκθεση στους μολυσματικούς παράγοντες και πιθανόν να παίζει έναν αναπάντεχο ρόλο στην επιδημιολογία του καρκίνου.

Καρκίνοι διαφορετικών τύπων, παρατηρείται να είναι ευαίσθητοι σε πολλούς από τους γνωστούς ογκολυτικούς ιούς. Στην προκειμένη περίπτωση, ο ΚΠΕ έχει εμφανίσει ευαισθησία στην νόσο του Newcastle (ψευδοπανόλη- νόσος των πουλερικών)<sup>184</sup>, σε ρεοϊούς (οικογένεια ιών που μπορούν να επηρεάσουν το γαστρεντερικό σύστημα και την αναπνευστική οδό<sup>186</sup>), καθώς



και στο εξασθενημένο σύμπλεγμα των ερπητοϊών<sup>182,184</sup>. Συγκεκριμένα, οι ρεοϊοί βρέθηκαν να μολύνουν το 80% ενός ευρέως φάσματος ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων σε δοκιμασίες *in vitro*<sup>186</sup>, και η φυσαλιδώδης στοματίτιδα διαπιστώθηκε να επηρεάζει το 90% των όγκων<sup>187</sup>.

Ευαισθησία, σημαίνει ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο πιθανόν να υποκύψουν σε αυτούς τους ιούς από ότι τα υγιή κύτταρα, και αυτό συμβαίνει στην πραγματικότητα. Άγριου τύπου παρβοϊοί, για παράδειγμα, αποδείχθηκε να είναι δέκα φορές πιο πιθανό να μολύνουν τα καρκινικά κύτταρα του ήπατος σε σχέση με τα υγιή<sup>188</sup>, και οι συγκεντρώσεις της σαλμονέλας εμφανίζονται 1000 φορές σε υψηλότερη συγκέντρωση στους όγκους, από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα των ποντικών<sup>189</sup>. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι ασυνήθιστα ευαίσθητα στην προσβολή από βακτήρια ή ιούς. Με την σειρά τους, οι ανοσολογικές αποκρίσεις, έχουν σημειωθεί τακτικά σε κλινικές δοκιμές με ογκολυτικούς ιούς, και φαίνεται ότι μειώνουν την αποτελεσματικότητα όμως δεν σταματούν τον ιό από τη δράση του<sup>190,191</sup>. Ως εκ τούτου, ένα άτομο μπορεί εύκολα να επωφεληθεί από την έκθεση σε ογκολυτικούς ιούς, ακόμα και μετά την ανάπτυξη ανοσίας<sup>192,193</sup>.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ιοί και βακτήρια που συνδέονται με την καρκινογένεση<sup>194-196</sup>. Κύριος τρόπος λειτουργίας τους είναι η εισαγωγή αστάθειας και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, που αποτελεί το σήμα κατατεθέν της γήρανσης και του καρκίνου<sup>197-202</sup>. Το ελικοβακτηρίδιο καθώς και ένα στέλεχος του εντεροκόκκου, είναι βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα που έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τις δύο παραπάνω καταστάσεις<sup>203-207</sup>. Αυτά, και άλλα βακτήρια, έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη μεταγραφή και μετάφραση των βασικών υπομονάδων των μεγάλων οδών επιδιόρθωσης του DNA<sup>208,209</sup> και αυξάνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου<sup>210</sup>. Οι μηχανισμοί αυτοί, μπορούν να συμβάλλουν στην κυτταρική γήρανση του πεπτικού συστήματος και στην ογκογένεση<sup>211,212</sup>.

#### 1.6.4 Δημογραφικοί Παράγοντες

Εκτός από τους κινδύνους του περιβάλλοντος, το γεωγραφικό μέρος διαβίωσης, τον τρόπο ζωής και διατροφής, τα τοξικά υλικά, σημαντική κρίνεται από τη διεθνή βιβλιογραφία και η συμβολή παραγόντων όπως είναι οι δημογραφικοί. Παραδείγματα τέτοιων παραγόντων αποτελούν η ηλικία του ατόμου, η οικογενειακή κατάσταση, το φύλλο και το βιοτικό επίπεδο.

Είναι λίγα τα δεδομένα από την επιστημονική κοινότητα τα οποία συνδέουν άμεσα την ηλικία με τον ΚΠΕ. Σε διάφορες μελέτες όμως, υποστηρίζεται ότι στους ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, ο ΚΠΕ αποτελεί συχνό φαινόμενο. Σε επιδημιολογικές μελέτες, παρατηρείται ότι το μισό ποσοστό των καρκίνων αφορούν άτομα άνω των 65 ετών<sup>213</sup>.

Ο καρκίνος είναι η κύρια αιτία θανάτου μεταξύ των γυναικών ηλικίας 40-79 ετών, και ανδρών ηλικίας 60-79 ετών<sup>214</sup>. Τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω αυξανόμενης ευημερίας των λαών, το προσδόκιμο ζωής στις αναπτυσσόμενες χώρες έχει βρεθεί υψηλότερο, όσο είναι και στις αναπτυγμένες χώρες. Περαιτέρω αυξήσεις στο προσδόκιμο ζωής αναμένονται στο εγγύς μέλλον. Τα ποσοστά εμφάνισης ΚΠΕ συνέχισαν να αυξάνονται στις υπό ανάπτυξη χώρες, ενώ ποσοστά σταθεροποιήθηκαν ή και μειώθηκαν στις αναπτυγμένες χώρες<sup>215</sup>. Ωστόσο η ηλικιακή κατανομή των ασθενών με ΚΠΕ ποικίλλει μεταξύ των χωρών<sup>216,217</sup>. Η διάμεσος της ηλικίας των ασθενών με ΚΠΕ έχει αυξηθεί σε ορισμένες χώρες ενώ μειώθηκε σε άλλες. Συνεπώς η επίδραση της ηλικίας στο ΚΠΕ δεν είναι απολύτως σαφής<sup>218</sup>. Πάραυτα, προτείνεται, από τις περισσότερες μελέτες, ο δείκτης της ηλικίας να συμπεριλαμβάνεται στα προληπτικά τεστ<sup>213</sup>.

#### 1.7 Σταδιοποίηση

Η πρώτη σταδιοποίηση προτάθηκε αρχικά από τον Duke το 1937. Αρχικά αφορούσε τα καρκινώματα του ορθού και αργότερα και τα καρκινώματα του υπόλοιπου παχέος εντέρου. Η σταδιοποίηση περιλαμβάνει τρία στάδια, το Α, το Β και το C, ως ακολούθως:

Στάδιο Α: απουσία επεκτάσεως του καρκινώματος πέρα από το μυϊκό τοίχωμα.

Στάδιο Β: επέκταση του καρκινώματος πέρα από το μυϊκό τοίχωμα, χωρίς διήθηση επιχώριων λεμφαδένων.

Στάδιο C: διήθηση επιχώριων λεμφαδένων, ανεξαρτήτως του βάθους διηθήσεως του τοιχώματος.

Η σταδιοποίηση αυτή τροποποιήθηκε από τον Kirklin και αργότερα από τους Astler και Coller. Η σταδιοποίηση κατά Astler-Coller περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

Στάδιο A: εντοπισμός νεοπλάσματος στον βλεννογόνο

Στάδιο B1: διήθηση χωρίς διάσπαση της έξω μυϊκής στιβάδας και χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Στάδιο B2: διάσπαση της έξω μυϊκής στιβάδας χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Στάδιο C1: περιορισμός του νεοπλάσματος στο τοίχωμα του εντέρου με λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Στάδιο C2: διάσπαση του τοιχώματος με λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Η ανάγκη για μια περισσότερο ομοιογενή και κατανοητή από τους κλινικούς ιατρούς σταδιοποίηση, οδήγησε την Αμερικανική Επιτροπή για τον Καρκίνο (AJCC) και τη Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (UICC) στη σταδιοποίηση του καρκινώματος του παχέος εντέρου με βάση το σύστημα TNM, ως ακολούθως:

### **Πρωτοπαθής όγκος**

TX: δεν υπάρχει δυνατότητα εκτίμησης της πρωτοπαθούς εστίας

T0: δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς εστίας

Tis: καρκίνωμα in situ ή ενδοβλεννογόνιο

T1: καρκίνωμα το οποίο διηθεί τον υποβλεννογόνιο

T2: καρκίνωμα το οποίο διηθεί το μυϊκό τοίχωμα

T3: καρκίνωμα το οποίο διηθεί το μυϊκό τοίχωμα, τον ορογόνο και το περιεντερικό λίπος

T3a: ελάχιστη διήθηση < 1 mm εκτός του μυϊκού τοιχώματος

T3b: ήπια διήθηση 1-5 mm εκτός του μυϊκού τοιχώματος

T3c: μέτρια διήθηση 5-15 mm εκτός του μυϊκού τοιχώματος

T3d: ικανή διήθηση > 15 mm εκτός του μυϊκού τοιχώματος

T4: καρκίνωμα το οποίο διηθεί γειτονικά όργανα και ιστούς

### Επιχώριοι Λεμφαδένες

NX: αδυναμία εκτίμησης επιχωρίων λεμφαδένων

N0: απουσία διηθήσεως λεμφαδένων

N1: διήθηση 1-3 λεμφαδένων

N2: διήθηση  $\geq 4$  λεμφαδένων

### Μεταστάσεις

MX: αδυναμία εκτίμησης απομακρυσμένων μεταστάσεων

M0: απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

M1: παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

RO: απουσία υπολειμματικού όγκου

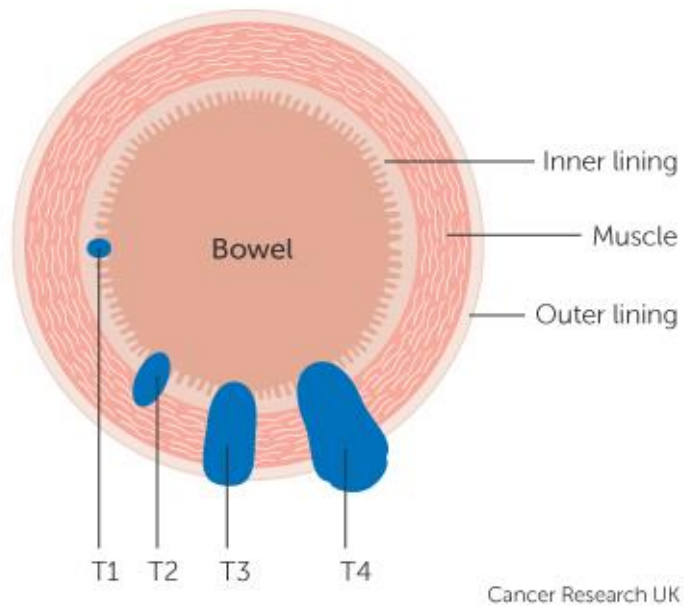
R1: μικροσκοπική εστία υπολειμματικού όγκου

R2: μικροσκοπικός υπολειμματικός όγκος

TNM (AJCC/UICC)	Astler-Coller		Duke
Στάδιο 0	Tis N0 M0	-	-
Στάδιο I	T1 N0 M0	Στάδιο A	A
	T2 N0 M0	Στάδιο B1	A
Στάδιο IIA	T3 N0 M0	Στάδιο B2	B
Στάδιο IIB	T4 N0 M0	Στάδιο B3	B
Στάδιο IIIA	T1T2 N1 M0	Στάδιο C1	C
Στάδιο IIIB	T3T4 N1 M0	Στάδιο C2, C3	C
Στάδιο IIIC	κάθε T N2 M0	Στάδιο C1, C2, C3	C
Στάδιο IV	κάθε T και N M1		Στάδιο D

### Πίνακας 1: αντιστοιχία των διαφόρων ταξινομήσεων του ΚΠΕ

Η προγνωστική αξία του κυκλοτερούς ορίου εκτομής είναι ανεξάρτητη από τη σταδιοποίηση κατά TNM.



**Εικόνα 5:** Τρόπος διεξαγωγής σταδιοποίησης TNM.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

#### 2.1. Βιολογία Καρκινικού Κυττάρου

Τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να υπακούσουν σε σήματα ελέγχου, αύξησης και διαίρεσης. Ως εκ τούτου, διαιρούνται συνεχώς με αποτέλεσμα να μη σταματάει ο πολλαπλασιασμός τους. Ταυτόχρονα όμως έχουν χάσει την ικανότητα της απόπτωσης, δηλαδή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε περίπτωση βλάβης του κυττάρου. Μόλις μεγαλώσει λίγο ο σχηματισμός των κυττάρων αρχίζει να εκλύει παράγοντες όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ώστε να δημιουργήσει αγγεία, να προκαλέσει δηλαδή αγγειογένεση προκειμένου να εξασφαλίσει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Χωρίς αγγειογένεση μια νεοπλασματική οντότητα δεν μπορεί να περάσει το μέγεθος του μισού εκατοστού σε διάμετρο<sup>219</sup>.

Τα κύτταρα έχουν μια συγκεκριμένη διάρκεια ζωής που καθορίζεται από τα τελομερή (τμήματα στο τέλος των χρωμοσωμάτων) που προάγουν την απόπτωση. Μετά από ένα αριθμό διαιρέσεων το DNA μικραίνει δραματικά, τα τελομερή ενώνονται και το κύτταρο καταστρέφεται. Το καρκινικό κύτταρο για να αποφύγει την απόπτωση, παράγει την τελομεράση, μπλοκάροντας με τον τρόπο αυτό τα τελομερή. Γίνεται κατά κάποιον τρόπο αθάνατο. Έπειτα αρχίζει την διαδικασία της μετάστασης, την αποστολή δηλαδή καρκινικών κυττάρων σε άλλα σημεία του σώματος. Σπανίως κάποιος ασθενής πεθαίνει από τον πρωτογενή όγκο. Οι περισσότεροι σχεδόν καταλήγουν από τις μεταστάσεις, την καχεξία, την υποθρεψία και τις λοιμώξεις<sup>220</sup>.

Για να επιβιώσει και να εξελιχτεί το καρκινικό κύτταρο πρέπει να αποφύγει την ανοσολογική αντίδραση από τα NK, T-λεμφοκύτταρα και B-λεμφοκύτταρα. Για να το πετύχει αυτό, το καρκινικό κύτταρο ενσωματώνεται σε δομές αιμοπεταλίων και αδρανοποιεί πρωτεΐνες στόχους. Αυτό όχι μόνο το προστατεύει αλλά το γεμίζει και με θρεπτικά συστατικά. Τέλος, συμβάλλοντας στην παραγωγή κυτοκινών αδρανοποιεί τα T-λεμφοκύτταρα. Έτσι σχηματίζεται συνδετικός ιστός που το περιβάλλει και το διαφυλάττει<sup>219</sup>.

Στην τελική μορφή εμφανίζεται σε έναν όγκο ένα σύνολο διαφορετικών κυττάρων, μικρό τμήμα των οποίων είναι τελικά τα καρκινικά, τα υπόλοιπα είναι

συνδετικός ιστός, αγγειακό δίκτυο, ινώδη στοιχεία, νεκρώσεις στο κέντρο, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα<sup>221</sup>.

## 2.2 Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός και Απόπτωση

Κυτταρικός κύκλος καλείται η χρονική περίοδος από την έναρξη μιας κυτταρικής διαίρεσης μέχρι την έναρξη της επόμενης. Η διαίρεση των κυττάρων απαιτεί δύο διαδοχικές διαδικασίες. Η πρώτη είναι η Σύνθεση (ή φάση S), κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιείται η αντιγραφή του περιεχόμενου του DNA. Κατά τη δεύτερη φάση (M) παρατηρείται η διαίρεση του γονιδιώματος στη διάρκεια της μίτωσης. Αυτό αποσκοπεί στην παραγωγή γενετικού υλικού με σκοπό την παραγωγή δύο πανομοιότυπων κυττάρων<sup>222</sup>.

Μια ομάδα σερίνο-θρεονινο-κινασών (οι οποίες καλούνται κύκλινο εξαρτώμενες κινάσες, Cyclin Dependent Kinases- CDKs) είναι τα βασικά στοιχεία που ρυθμίζουν τους μηχανισμούς S και M φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Αυτές οι κινάσες είναι ενεργείς μόνον όταν σχηματίσουν συμπλέγματα με ασταθή μόρια που ρυθμίζουν τη δράση τους. Τα μόρια αυτά ονομάζονται κυκλίνες και η συγκέντρωσή τους αυξομειώνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου<sup>223</sup>.

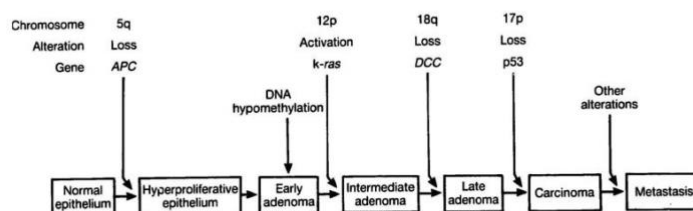
Ένα εξωκυττάριο ερέθισμα προκαλεί την εκκίνηση του κυτταρικού κύκλου. Έτσι ενεργοποιείται μια σειρά από ενδοκυττάρια βιοχημικές μεταβολές, που αποτελούν την οδό μεταγωγής του σήματος (signal transduction pathway). Αποδέκτης αυτών των σημάτων είναι το σύμπλεγμα κυκλίνης D-CDK4,6 το οποίο προς το τέλος της G1 φάσης, ενεργοποιεί την κυκλίνη E-CDK2. Οι δύο αυτές CDKs έχουν σαν κύριο στόχο το σύμπλεγμα pRb/E2F-DP. Η φωσφορυλίωση του τελευταίου απελευθερώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F-DP, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν, μεταξύ των άλλων, μόρια της αντιγραφικής μηχανής όπως, πολυμεράση-α, κ.τ.λ. Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος pRb/E2F-DP σηματοδοτεί το σημείο χωρίς επιστροφή (Restriction point) προς τη φάση S<sup>224</sup>.

Μόλις ολοκληρωθεί η αντιγραφή, το κύτταρο αρχίζει να παράγει σταδιακά, κυκλίνη B, η οποία συνδέεται με την CDK1. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελεί τον παράγοντα που προάγει την μίτωση (mitosis-promoting factor,

MPF). Η πλήρως ενεργοποιημένη CDK1, φωσφορυλιώνει μία σειρά από δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη συσπείρωση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων και την αναδιάταξη των μικροϊνιδίων, των πυρηνικών λαμινών και των ενδιάμεσων ινιδίων<sup>225</sup>.

Τα βιοχημικά αυτά γεγονότα είναι μείζονος σημασίας προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μετάβαση στη φάση M. Η μίτωση αρχίζει με την πρόφαση και συνεχίζει με τη διαμόρφωση της μιτωτικής ατράκτου και του μεταφασικού δίσκου (μετάφαση). Στο συγκεκριμένο στάδιο το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που προάγει την ανάφαση (Anaphase Promoting Complex), ενεργοποιείται από τις μιτωτικές CDKs (CDK1-cdc2). Το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα επίσης πρωτεολύει την κυκλίνη B, στάδιο απαραίτητο για την έξοδο του κυττάρου από την τελόφαση<sup>226</sup>.

### A genetic model for colorectal tumorigenesis.



Fearon ER, Vogelstein B. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67

**Εικόνα 6:** Το γενετικό μοντέλο της ανάπτυξης ΚΠΕ.

Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί εξασφαλίζουν την κατανομή και την αντιγραφή του γενετικού υλικού. Πάραυτα η πιστότητα και ισοκατανομή της διαδικασίας της αντιγραφής δεν διασφαλίζεται απόλυτα. Δηλαδή ενώ εξασφαλίζεται ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου, εμποδίζεται δυστυχώς η διαφοροποίησή του. Για το λόγο αυτό όμως το ίδιο το κύτταρο έχει αναπτύξει εξελικτικά μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου του ίδιου του του κύκλου έτσι ώστε να μπορεί να ανταποκριθεί σε οποιαδήποτε δυσκολία του περιβάλλοντος. Αυτό μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις, οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να



οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή σε νεοπλασματική εκτροπή. Σε περίπτωση αποτυχίας επιδιόρθωσης του DNA, ενεργοποιείται ο μηχανισμός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου<sup>227</sup>.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να αδρανοποιηθούν και με τον τρόπο αυτό παύει ο έλεγχος της κυτταρικής ανάπτυξης. Έτσι κλώνοι που υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να μην κατάφερναν να επιβιώσουν, καταφέρνουν να επεκταθούν. Η απώλεια λειτουργίας των γονιδίων σταθερότητας, μπορεί επίσης να συντελέσει στην εμφάνιση ενός καρκινικού κυττάρου. Και αυτό διότι εμφανίζεται αδυναμία επιδιόρθωσης των λαθών, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και συνεπώς συσσωρεύονται μεταλλάξεις<sup>228</sup>.

Οι Vogelstein και Fearon με ένα άρθρο τους στο περιοδικό Cell, συγκεντρώνοντας όλα τα μέχρι τότε δεδομένα για την γενετική του ΚΠΕ, πρότειναν ένα μοριακό-γενετικό μοντέλο περιγραφής της καρκινογένεσης. Το μοντέλο αυτό αποτέλεσε σημείο αναφοράς για την μελέτη της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο αλλά και σε μια σειρά άλλους όγκους.

Τα βασικά σημεία που διατυπώθηκαν σε αυτό το άρθρο και εξακολουθούν να διατηρούν την ισχύ τους μέχρι σήμερα είναι:

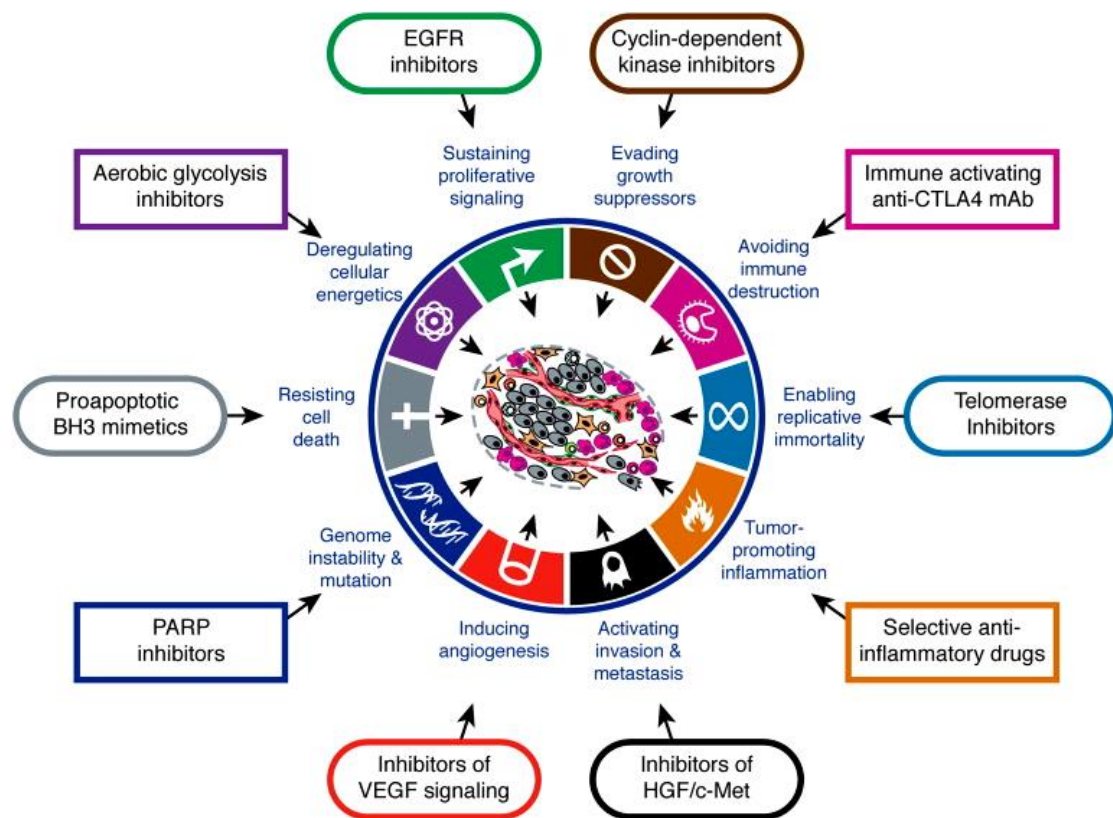
- Κληρονομούμενοι και περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου.
- Σχεδόν όλοι οι όγκοι του παχέος εντέρου προέρχονται από καλοήθεις αλλοιώσεις.
- Μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια ευθύνονται για την ανάπτυξη του ΚΠΕ.
- Απαιτούνται μεταλλάξεις σε τουλάχιστον 4 με 5 γονίδια ταυτόχρονα για την ανάπτυξη κακοηθών όγκων του παχέος εντέρου.
- Το σύνολο και όχι η αλληλουχία των γονιδίων που μεταλλάσσονται, είναι το καθοριστικό για την εμφάνιση κακοήθειας<sup>229</sup>.

### **2.3 Καρκινικά Γονίδια και Μονοπάτια**

Οι γνώσεις μας σχετικά με την γενετική βάση του καρκίνου αυξάνονται παράλληλα με την χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, καθώς επιτρέπουν την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, τις λεπτομέρειες και τους περιορισμούς του αναδιπλασιασμού του DNA, της απόπτωσης, της αγγειογένεσης, της διήθησης και τέλος της μετάστασης<sup>230</sup>.

Ένα από τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά του κακοήθους κυττάρου είναι η ικανότητά του για ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι μηχανισμοί ελέγχου του πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού κύκλου, στο συγκεκριμένο κύτταρο, ανευρίσκονται ελαττωματικοί. Στην φάση αυτή, έχουμε την εμφάνιση νέων χαρακτηριστικών σε μεταλλαγμένα γονίδια, ή την ισχυροποίηση μεμονωμένα, μιας ήδη υπάρχουσας λειτουργίας ενός γονιδίου.



**Εικόνα 7:** Μονοπάτια και σήματα καρκινογένεσης<sup>230</sup>.

Τα γονίδια τα οποία εμφανίζουν τέτοια χαρακτηριστικά αναφέρονται ως πρωτοογκογονίδια. Τα πρωτοογκογονίδια συνήθως κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αύξηση ή την διαίρεση του κυττάρου. Αντίστοιχα γονίδια που σχετίζονται με την απώλεια λειτουργικών μεταλλάξεων, που σχετίζονται με την καρκινογένεση, ονομάζονται ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συνήθως κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναστολή της αύξησης και του πολλαπλασιασμού. Οι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι υπολειπόμενες, με αποτέλεσμα να μην επαρκούν για την πρόκληση καρκινογένεσης. Καθώς τα γονίδια διαθέτουν και αλληλόμορφο γονίδιο όμως, η καρκινογένεση επέρχεται με την παράλληλη μετάλλαξη στο υγιές αλληλίο με αποτέλεσμα την απώλεια της ετεροζυγίας<sup>231</sup>.

Ένα ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός πρέπει να έχει ένα ισχυρό σήμα πολλαπλασιασμού που υπερέχει των ενδογενών ρυθμιστικών μηχανισμών και την αποδιοργάνωση του μηχανισμού γήρανσης, ώστε θεωρητικά το κύτταρο να γίνει αθάνατο. Όμως, επιστήμονες ισχυρίζονται ταυτόχρονα ότι, ισχυρά μηνύματα πολλαπλασιασμού δημιουργούν ισχυρές απαντήσεις στρες με συνέπεια την αποδιοργάνωση του μηχανισμού θανάτου του κυττάρου. Συνεπώς τα ίδια σήματα ενέχουν το μήνυμα του πολλαπλασιασμού και της αθανασίας. Παρόλο που έχουν εντοπιστεί πολλοί τέτοιοι μηχανισμοί με αντίστοιχα μονοπάτια καρκινογένεσης, θα αναφερθούν μόνο αυτά που έχουν μελετηθεί καλά<sup>230</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΤΟ APC ΣΤΟΝ ΚΠΕ

#### 3.1 Η δομή και η λειτουργία της πρωτεΐνης

Το γονίδιο APC κωδικοποιεί μια μεγάλη πρωτεΐνη, με πολλές διαφορετικές λειτουργικές περιοχές, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην οδό Wnt, στην προσκόλληση και επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων καθώς και στην λειτουργική ακεραιότητα του κυτταροσκελετού. Κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του συνδρόμου της ΟΑΠ<sup>232</sup>, ενώ σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου ανευρίσκονται σε 60-80% των σποραδικών περιπτώσεων του ΚΠΕ<sup>233</sup>.

Το γονίδιο APC βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 (5q 21-22). Έχει βάρος πάνω από >160 Kb και περιλαμβάνει 21 εξόνια. Στην πιο κοινή του μορφή συναντάται με 15 εξόνια, λόγω της διαδικασίας εναλλακτικής ανακατάταξης. Από αυτά, το εξόνιο 15 αποτελεί >75% της κωδικοποιημένης περιοχής του γονιδίου, όπως αυτό εκφράζεται στο mRNA. Το τελικό προϊόν του APC είναι μια πρωτεΐνη 2.843 αμινοξέων και μοριακού βάρους περίπου 300kD<sup>234</sup>.

Η πλειονότητα των κληρονομούμενων και σωματικών μεταλλάξεων του APC βρίσκεται στο εξόνιο 15, ενώ ειδικά για τις σωματικές μεταλλάξεις, αυτές στο μεγαλύτερο ποσοστό τους, που ξεπερνά το 60% των περιπτώσεων, ανιχνεύονται σε μια μικρή περιοχή του εξονίου 15, η οποία ονομάζεται Mutation Cluster Region (MCR) αποτελούμενη από 600 βάσεις περίπου, κωδικοποιώντας μια περιοχή 200 αμινοξέων. Η περιοχή αυτή βρίσκεται στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης και μεταλλάξεις, έχουν στην πλειοψηφία τους σαν αποτέλεσμα, την παραγωγή ακρωτηριασμένης και συνήθως μη λειτουργικής πρωτεΐνης, με τις ανάλογες συνέπειες για το πλήθος των λειτουργιών με τις οποίες σχετίζεται το APC<sup>235</sup>.

Η πρωτεΐνη APC αποτελείται από λειτουργικά διαφοροποιημένες περιοχές, με συγκεκριμένες λειτουργίες, ενώ για μερικές από αυτές δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί ο ρόλος τους. Η περιοχή σύνδεσης με την β-κατενίνη αποτελείται από αλληλουχίες 15 αμινοξέων και 20 αμινοξέων σε 7 ακολουθίες. Ενδιάμεσα στις ακολουθίες των 20 αμινοξέων βρίσκονται 3 περιοχές για την σύνδεση του APC με μια άλλη βασική πρωτεΐνη, την αξίνη<sup>236</sup>.

Το τμήμα αυτό του APC είναι και ο συχνότερος στόχος των μεταλλάξεων στο γονίδιο και όπως είναι επόμενο, οι μεταβολές του, έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μιας μη λειτουργικής πρωτεΐνης, όπως έχει μελετηθεί στο σύνδρομο FAP αλλά και στις σποραδικές μορφές κολοορθικού καρκίνου<sup>237</sup>.

### **3.2 Η συμβολή της πρωτεΐνης στον κυτταρικό κύκλο**

Η ανακάλυψη του γονιδίου APC αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα για την κατανόηση της καρκινογένεσης των νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου, καθώς επίσης και στην κατανόηση της λειτουργίας των ογκογονιδίων. Κληρονομούμενες μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου έχουν σαν αποτέλεσμα το σύνδρομο FAP και ταυτόχρονα ανευρίσκονται και στην πλειοψηφία των σποραδικών μορφών του ΚΠΕ. Η πρωτεΐνη APC μαζί με κάποιες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που συνδέονται με το APC, ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τη μετανάστευση και την απόπτωση των κυττάρων. Όλα αυτά γίνονται μέσα στα πλαίσια της οδού μεταγωγής σημάτων Wnt<sup>238,239</sup>. Η ενεργοποίηση αυτής της οδού έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την έναρξη μεταγραφικής δραστηριότητας στον πυρήνα και την τελική έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων. Η ανάλυση της δομής της οδού Wnt έχει δείξει ότι βασικό ρόλο στην λειτουργία της παίζουν το APC και η β-κατενίνη, μέσω ενός μηχανισμού ρύθμισης των επιπέδων της β-κατενίνης από το APC. Οι κύριες λειτουργίες του APC είναι η σύνδεση μεμβρανικών πρωτεϊνών με τον κυτταροσκελετό, η κυτταρική επικοινωνία και η ρύθμιση των επιπέδων της β-κατενίνης μέσω της παρεμπόδισης της συσσώρευσης της κυτταροπλασματικής και πυρηνικής β-κατενίνης, μεσολαβώντας έτσι, στη φωσφορυλίωση και την αποδόμησή της. Τέλος το APC συμμετέχει επίσης και στην κινητικότητα και την μετακίνηση του κυττάρου<sup>240</sup>.

Η β-κατενίνη βρίσκεται συνεχώς κάτω από την ρυθμιστική παρέμβαση ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών, τα οποία διατηρούν σε χαμηλά επίπεδα την ποσότητά της στο κύτταρο. Σε αυτό το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, βασικό ρόλο διαδραματίζει η λειτουργία του APC. Η β-κατενίνη αλληλοεπιδρά με την κυτταροπλασματική επιφάνεια μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, της καντερίνης και την συνδέει με την α-κατενίνη, που με την σειρά της συνδέει το σύμπλεγμα αυτό με τον κυτταροσκελετό. Στην συνέχεια, ανακαλύφθηκε και ο σημαντικός

της ρόλος της, στην οδό μεταγωγής σημάτων Wnt. Η β-κατενίνη αποτελείται από μια κεντρική περιοχή, η οποία περιέχει 12 ακολουθίες των 42 αμινοξέων, γνωστών ως ακολουθίες armadillo. Μέσω αυτών, συνδέεται με την καντερίνη και την α-κατενίνη, στην μεμβράνη του κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα συνδέεται με το APC και την αξίνη και στον πυρήνα του κυττάρου με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Tcf/Lef.

### 3.3 Η φαινοτυπική και γονοτυπική έκφραση της πρωτεΐνης

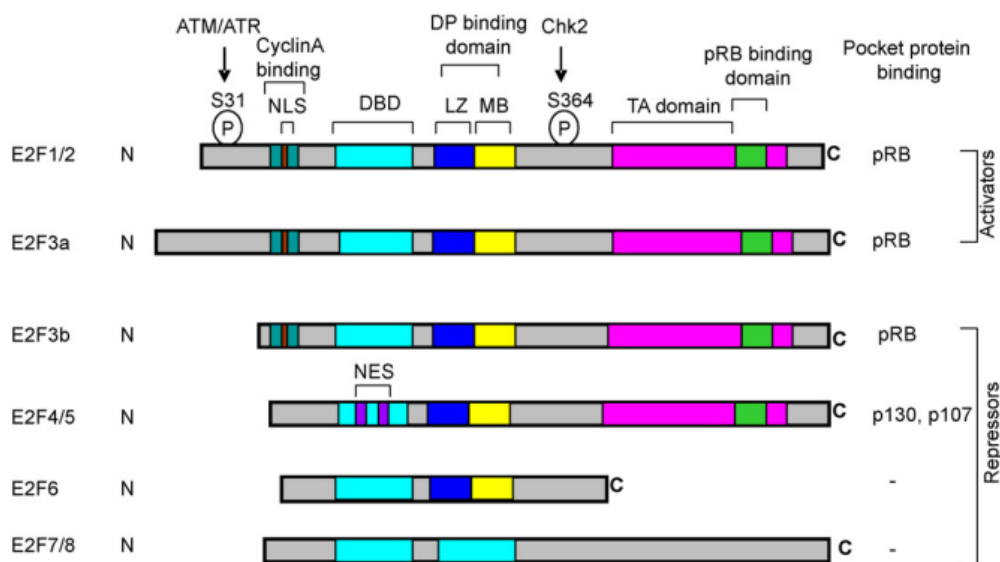
Η θέση της κληρονομούμενης μετάλλαξης, καθορίζει την φαινοτυπική έκφραση αλλά και την βαρύτητα του συνδρόμου στην οικογενή πολυποδίαση. Μεταλλάξεις μεταξύ των βάσεων 3747 και 3990 σχετίζονται με την παρουσία εξαιρετικά μεγάλου αριθμού όγκων, ενώ μεταλλάξεις είτε στο 5' αμινοτελικό είτε προς το 3' καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου, σχετίζονται με ηπιότερη κλινική εικόνα δηλαδή λιγότερα αδενώματα <1000<sup>241</sup>. Αντίστοιχες μεταλλάξεις στο 1309, κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο, σε νεαρότερη ηλικία έχουν σοβαρότερη νόσο. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αλληλία Attenuated APC μπορεί να κωδικοποιούν πρωτεΐνες με υπολειμματική λειτουργικότητα, διότι ορισμένα από τα αλληλία αυτά υπόκεινται σε σωματικές μεταλλάξεις ή και χάνονται εξολοκλήρου κατά την ανάπτυξη των όγκων. Για αυτό, οι εξω-εντερικές εκδηλώσεις του συνδρόμου φαίνεται ότι εκδηλώνονται σε ασθενείς με μεταλλάξεις κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο<sup>242</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΤΟ E2F1 ΣΤΟΝ ΚΠΕ

#### 4.1 Δομή και Λειτουργία πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων E2F. Η E2F οικογένεια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, καθώς και την δράση καρκινικών πρωτεϊνών και αποτελεί επίσης, στόχο των πρωτεϊνών ογκογόνων που μετασχηματίζουν μικρά μόρια DNA<sup>243</sup>.



**Εικόνα 8:** Η δομή της οικογένειας πρωτεϊνών E2F<sup>243</sup>.

Οι E2F πρωτεΐνες περιέχουν διάφορες εξελικτικές περιοχές οι οποίες εντοπίστηκαν στα περισσότερα μέλη της οικογένειας. Αυτά τα πεδία περιλαμβάνουν ένα πεδίο δέσμης DNA, έναν τομέα διμερισμού ο οποίος προσδιορίζει την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες διαφοροποίησης του μεταγραφικού παράγοντα, έναν τομέα διενεργοποίησης εμπλουτισμένο με όξινα αμινοξέα, και μια περιοχή σύνδεσης ογκοτασταλτικής πρωτεΐνης η οποία είναι ενσωματωμένη πάνω στον τομέα αυτό. Αυτή η πρωτεΐνη προσδένεται κατά προτίμηση με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRB με έναν ιδιαίτερο τρόπο εξάρτησης. Μπορεί να μεσολαβήσει τόσο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όσο και στην εξαρτώμενη ή μη, από το p53 απόπτωση.

Υπάρχουν δύο είδη πρωτεϊνών σύνδεσης, στα αλληλόμορφα της οικογένειας της E2F, οι DP1 και DP2, τα οποία μοιράζονται την συντηρημένη περιοχή δέσμευσης του DNA και τους τομείς διμερισμού της E2F1<sup>244</sup>.

Τα μέλη της οικογένειας E2F μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο ομάδες: τους ενεργοποιητές E2F (E2F1-3) και τους καταστολείς της οικογένειας E2F (E2F4-8), βάση της ομόλογης αλληλουχίας και των λειτουργικών τους ιδιοτήτων<sup>245</sup>. Τελευταίες έρευνες έχουν δείξει ότι οι E2F7-8 είναι δυο μέλη της ίδιας οικογένειας, όμως δεν περιέχουν ούτε θέσεις υποδοχής, ούτε πεδία σύνδεσης των πρωτεϊνών DP<sup>246</sup>. Αν και όλο αυτό το σύμπλεγμα ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου - στόχου, πιστεύεται ότι η επιλογή δράσης του μορίου (αναστολέας ή καταστολέας) εξαρτάται από την οικογένεια E2F. Τα γονίδια από E2F1 έως το E2F5, διαθέτουν περιοχές στο καρβοξυτελικό τους άκρο, μέσω των οποίων συνδέονται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Rb (pRB, p107, p130 οι οποίες είναι γνωστές ως πρωτεΐνες τσέπης), και ρυθμίζουν αρνητικά την μεταγραφική δραστηριότητα (η σύνδεση αυτή απενεργοποιεί τις E2F1, E2F2 και E2F3 με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προκαλέσουν μεταγραφή των προ-πολλαπλασιαστικών γονιδίων). Ενώ οι E2F1 έως την E2F3α αλληλεπιδρούν κυρίως με την pRB, με αποτέλεσμα να οδηγούν στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, η E2F4 συνδέεται με όλα τα τρία μέλη της pRB. Η E2F5 συνδέεται κατά προτίμηση με την p107 και την p130, και δρουν κυρίως για να διευκολύνουν την έξοδο του κυτταρικού κύκλου και την τελική διαφοροποίηση με την πρόσληψη της πρωτεΐνης τσέπης<sup>243</sup>. Πιο συγκεκριμένα, μετά την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRB, οι ελεύθερες E2F1 πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, συμπεριλαμβανομένου της κυκλίνης E, η οποία συνδέεται με την Cdk, η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει περαιτέρω την pRB αυξάνοντας τα επίπεδα των E2F γονιδίων σε σημείο να προκαλεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της μεταγραφής πολλών γονιδίων στην S-φάση<sup>247</sup>.

#### **4.2 Συμβολή της πρωτεΐνης στον κυτταρικό κύκλο**

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών της οικογένειας E2F είναι η ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφικής



διαδικασίας των γονιδίων στόχων. Συνδέεται με μια ποικιλία από κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού του κυττάρου, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης<sup>248</sup>. Έχει διαπιστωθεί ότι μια αύξηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών συνδέεται άμεσα με μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό του κυττάρου ή και απόπτωση<sup>249</sup>, ενώ μειωμένη έκφρασή τους γενικά συνδέεται με την ικανότητα του κυττάρου να πολλαπλασιάζεται<sup>250</sup>. Σε φυσιολογικά κύτταρα, η δραστηριότητα των E2F ελέγχεται στενά σε πολλαπλά επίπεδα ρύθμισης, για να κρατηθεί η κυτταρική ομοιόσταση. Παρόλο που δεν έχουν καταγραφεί με σαφήνεια οι μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων αυτών, ένα προτεινόμενο μοντέλο είναι ότι η pRB πρωτεΐνη αναστέλλει την δραστηριότητα της E2F1, μέσω πρόσληψης μεταγραφικών παραγόντων καταστολής<sup>251</sup>.

Η πρωτεΐνη E2F1 έχει δείχθει ότι αλληλοεπιδρά με την CyclinA/cdk2 μέσω της περιοχής δέσμευσης CyclinA που βρίσκεται κοντά στο αμινοτελικό άκρο του ενεργοποιητή των E2F γονιδίων, η οποία προκαλεί φωσφορυλίωση και ρύθμιση της E2F δραστηριότητας στην φάση S. Με τον τρόπο αυτό αποκαλύπτει ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης της δραστηριότητας E2F1, που απαιτείται για να εισέλθουν τα κύτταρα στη φάση G2. Επιπλέον, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα των E2F1 ρυθμίζεται επίσης από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση και ακετυλίωση<sup>252</sup>. Το E2F1 είναι γνωστό ότι συνδέεται με το 30% των προαγωγών μεταγραφής γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Συνδέεται άμεσα με μια θέση συναίνεσης και προσλαμβάνει γονίδια σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο που συνδέονται με το μεταγραφικό μηχανισμό<sup>253</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΤΟ P14ARF ΣΤΟΝ ΚΠΕ

#### 5.1 Δομή και Λειτουργία πρωτεΐνης

Το γονίδιο INK4a/ARF (9p21) κωδικοποιεί δύο μοναδικές πρωτεΐνες, την P16INK4a και την P14ARF, οι οποίες μεταγράφονται από διαφορετικούς υποκινητές που βρίσκονται σε εναλλακτικά εξόνια και οι δύο έχουν σημαντικούς ρόλους στον κυτταρικό κύκλο. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι συγκολλημένες στην ίδια θέση στο εξόνιο 2.

Η P14ARF ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1995 τόσο στο ανθρώπινο γονιδίωμα<sup>254</sup> όσο και στα ινδικά χοιρίδια<sup>255</sup>. Ο γονιδιακός τόπος της είναι κοντά στον βραχίονα του χρωμοσώματος 9 στους ανθρώπους και βρίσκεται κοντά στα γονίδια της επαναλαμβανόμενης έκφρασης του INK4a και INK4b τα οποία είναι 16kDa (P16INK4a) και 15kDa (P15INK4b) αντίστοιχα. Υπάρχουν και άλλα INK4 σε άλλα χρωμοσώματα, ωστόσο δεν συνδέονται με τον καρκίνο, και έτσι οι λειτουργίες τους δεν είναι πιθανό να είναι επικαλυπτόμενες. Ένα σημαντικό εξαρτώμενο από την κυκλίνη υπόστρωμα είναι η πρωτεΐνη Rb του ρετινοβλαστώματος, η οποία φωσφορυλιώνεται στο τέλος της G1 φάσης, επιτρέποντας την έξοδο από την φάση αυτή. Η πρωτεΐνη Rb, περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αναστέλλοντας τη δράση των παραγόντων μεταγραφής E2F1, τα οποία ενεργοποιούν την μεταγραφή των γονιδίων που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA. Όταν η Rb φωσφορυλιώνεται από την κυκλίνη D και την E-εξαρτώμενη κινάση, κατά την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, η Rb δεν μπορεί να μπλοκάρει την εξαρτώμενη από το E2F1 μεταγραφή και το κύτταρο μπορεί να προχωρήσει με τη σύνθεση του DNA στην φάση S<sup>256</sup>.

#### 5.2 Συμβολή της P14ARF στον κυτταρικό κύκλο

Αμφότερες οι P16INK4a και P14ARF λειτουργούν ως καταστολείς όγκων, ερμηνεύοντας αποκρίσεις σε σήματα και ρυθμίζοντας δραστηριότητες των οδών pRb και p53<sup>257</sup>. Η πρωτεΐνη P16INK4a δεσμεύεται στην CDK4 και

CDK6 και αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα του συμπλόκου cdk4-cdk6/ένζυμο D, που απαιτείται για την φωσφορυλίωση του pRb. Η φωσφορυλίωση του pRb κατά την διάρκεια της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου, διαταράσσει την δυνατότητα σύνδεσής του με την ιστόνη αποακετυλάσης και του E2F1 μεταγραφικού παράγοντα, που επιτρέπει τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου<sup>258</sup>. Η πρωτεΐνη P14ARF επάγει την G1 φάση και την διακοπή της G2 φάσης, με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από τη p53<sup>259,260</sup>. Η P14ARF αλληλεπιδρά με την ογκοπρωτεΐνη Mdm2. Αυτό αποτρέπει την σύνδεση του p53 με το Mdm2<sup>262</sup> και εμποδίζει την αποικοδόμηση του p53 από το Mdm2 στο πρωτεόσωμα, σταθεροποιώντας έτσι το p53<sup>263,264</sup>. Από την στιγμή που το P14ARF επάγεται από το E2F1, σηματοδοτεί την βιοχημική σχέση των οδών pRb και p53<sup>265,266</sup>.

Το γονίδιο P16INK4a πολύ συχνά απενεργοποιείται από τις μεταλλάξεις, σε μια ευρεία ποικιλία ανθρώπινων όγκων. Οι μεταλλάξεις που αφορούν το εξόνιο 1β του γονιδίου P14ARF έχουν εντοπιστεί σε μεταστατικά μελανώματα, σε ΚΠΕ και σε πρωτογενή ορθοκολικά καρκινώματα. Η απάλειψη και απενεργοποίηση του γονιδίου P14ARF έχει εντοπιστεί σε ανθρώπινους καρκίνους, όμως η αυτούσια απενεργοποίηση του 1β εξονίου έχει εντοπιστεί να προκαλεί από μόνη της καρκίνο, ενώ η υπερμυθιλίωση του P14ARF – προαγωγού έχει περιγραφεί σε ΚΠΕ, γαστρικό καρκίνο<sup>267</sup>, ουροδόχου κύστεως, καρκίνο πνεύμονα και καρκίνο μαστού<sup>268</sup>.

Συνοψίζοντας, η απώλεια της λειτουργικότητας του INK4, ARF, Rb ή p53 οδηγούν σε καρκινογένεση. Χωρίς την INK4, η Cdk4/6 μπορεί να φωσφορυλιώσει με μη αποδεκτό τρόπο την Rb, οδηγώντας σε αύξηση της E2F1-εξαρτώμενη μεταγραφή του γονιδίου. Χωρίς την ARF η Mdm2 μπορεί να αναστείλει, μη αποδεκτά, την p53, οδηγώντας σε αυξημένη επιβίωση των κυττάρων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΚΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΙ67

Το αντιγόνο Κί67 αποτελεί μια πρωτεΐνη η οποία στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το ΜΚΙ67 γονίδιο<sup>269</sup>. Εκτός των άλλων, συσχετίζεται με την μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA<sup>270</sup>, ενώ η απενεργοποίηση του αντιγόνου Κί67 οδηγεί στην αναστολή της σύνθεσης του ριβοσωμικού RNA (rRNA)<sup>271</sup>. Αποτελεί αξιόπιστο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού<sup>272</sup>, καθώς ο ρόλος του στην κυτταρική διαίρεση εντοπίζεται στην διακοπή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όταν η πρωτεΐνη αυτή μπλοκάρεται, είτε από αντισώματα είτε με την ανασταλτική αποφωσφορυλίωση της σερίνης και θρεονίνης. Άλλη λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής είναι η σταθεροποίηση της μιτωτικής ατράκτου, προσλαμβάνοντας τον παράγοντα Hklp2 κατά την διάρκεια της μίτωσης<sup>273</sup>.

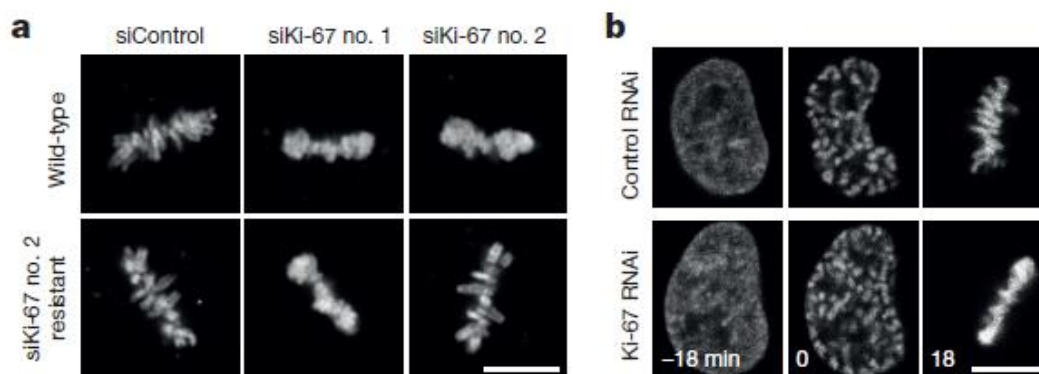
Η έκφραση του αντισώματος Κί67 έχει συσχετιστεί επίσης, με διάφορους τύπους κακοήθων αλλοιώσεων αποδεικνύοντας την παρουσία της μιτωτικής δραστηριότητας<sup>274-276</sup>. Πρόκειται για ένα μη-ιστονικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού των κυττάρων που συναντάται στον πυρήνα του κυττάρου και εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου εκτός από την G0 φάση (φάση ηρεμίας)<sup>277</sup>. Κατά την διάρκεια της μεσόφασης, το αντιγόνο Κί67 ανιχνεύεται αποκλειστικά, εντός του πυρήνα του κυττάρου, ενώ στην μίτωση το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης (έως και το 40%) μεταφέρεται στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων.

Συγκεκριμένα, η Κί67, η οποία αποτελεί κομμάτι της περιφέρειας του χρωμοσώματος, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αποτρέπει τα χρωμοσώματα να καταρρεύσουν και να γίνουν μονές χρωματινικές μάζες μετά την αποσυναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου. Με τον τρόπο αυτό επιτρέπει την ανεξάρτητη κινητικότητα των χρωμοσωμάτων και την αποτελεσματική αλληλεπίδραση με τη μιτωτική άτρακτο, χωρίς όμως να συμμετέχει στην εσωτερική δομή της μιτωτικής χρωματίνης<sup>278</sup>. Η κυτταρική κατανομή του Κί67 δεν είναι σταθερή, αλλά υφίσταται αλλαγές κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Η λειτουργία του Κί67 στον διαχωρισμό των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων, δεν περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο τομέα της πρωτεΐνης,

αλλά συσχετίζεται με το μέγεθος και το φορτίο των μεταλλάξεων αποκοπής. Η εξάντληση της πρωτεΐνης Ki67 προκαλεί ελαττώματα επανασυναρμολόγησης στον πυρηνίσκο, κατά την διάρκεια της πρώτης μιτωτικής εξόδου, δημιουργώντας έτσι μια «ανοργάνωτη» μεσοφασική ετεροχρωματίνη.

Σε σχετικές μελέτες επαναπροσδιορισμού του ρόλου της Ki67 στην εσωτερική δομή της χρωματίνης, διαπιστώθηκε ότι όταν τα περισσότερα χρωμοσώματα επισυνάπτονται στον πυρηνικό φάκελο, σε εξάντληση των αποθεμάτων Ki67, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται σε ξεχωριστά σώματα<sup>279</sup> (Εικόνα a). Ωστόσο, αμέσως μετά την διάσπαση του πυρηνικού φακέλου, τα χρωμοσώματα συγχωνεύονται σε μια ενιαία συμπαγή μάζα χρωματίνης (Εικόνα b). Ως εκ τούτου, η Ki67 δεν απαιτείται για την αρχική εξατομίκευση και δομή των χρωμοσωμάτων και την συμπύκνωση κατά την πρόφαση, αλλά για τη διατήρηση του χωρικού διαχωρισμού μετά την λύση του πυρηνικού φακέλου<sup>280</sup>.



**Εικόνες 9a & 9b:** Χωρικός διαχωρισμός των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. a: εμφάνιση χρωμοσωμάτων με έλλειψη Ki67 b: εμφάνιση χρωμοσωμάτων ως συμπαγή μάζα χρωματίνης<sup>280</sup>.

Η έκφραση του Ki67 στο κατώτατο τμήμα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου είναι ένα γεγονός που λαμβάνει χώρα σε ενεργές αλλοιώσεις και αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη του πολλαπλασιασμού και της εξέλιξης καρκινικών κυττάρων. Όσο αυξάνεται η έκφρασή του, τόσο αυξάνεται παράλληλα και η επιθετικότητα της βλάβης<sup>281</sup>, βοηθώντας έτσι στην πρόγνωση της εκάστοτε κακοήθειας<sup>282,283</sup>. Σε κλινικές μελέτες παρατηρήθηκε επίσης ότι, τα υψηλότερα στάδια του όγκου και η κομβική κατάσταση του καρκίνου σχετίζονται με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της Ki67. Ακόμα, υψηλότερα

επίπεδα έκφρασης της Ki67 βρέθηκε να συσχετίζεται με μεταστάσεις σε λεμφαδένες<sup>284</sup> σε πρωτογενείς όγκους. Επίσης, η αυξημένη συγκέντρωση Ki67 συσχετίζεται με παράλληλη μείωση της επιβίωσης των ασθενών. Μια άλλη συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ των υποδοχέων με στεροειδικές ιδιότητες και της έκφρασης του Ki67<sup>285-287</sup>. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των υποδοχέων οιστογόνων (ER) ήταν αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση του Ki67, υποδεικνύοντας ότι οι όγκοι με τη χαμηλότερη πολλαπλασιαστική δράση έχουν υψηλότερα ποσοστά θετικότητας στους οιστρογονικούς υποδοχείς<sup>286</sup>.

Η απουσία της σε αδρανή κύτταρα και η καθολική της έκφραση σε όλα τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα), κάνουν αυτήν την πρωτεΐνη έναν εξαιρετικό δείκτη για τον προσδιορισμό του κλάσματος ανάπτυξης ενός δεδομένου κυτταρικού πληθυσμού<sup>287</sup>. Με βάση όλα τα παραπάνω, διαπιστώνεται ότι η χρήση του Ki67 στους λεμφαδένες μπορεί να βοηθήσει και στην κατάλληλη επιλογή των θεραπειών για ορισμένες υποομάδες ασθενών<sup>288</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 7.1 Σκοπός

##### I. Διατύπωση προβλήματος

Τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη, έχει παρατηρηθεί αύξηση των περιπτώσεων ΚΠΕ, τόσο στην διάγνυσή του, όσο και στην θνησιμότητα. Το τελευταίο συμβαίνει παρά το γεγονός ότι έχουν αναβαθμιστεί και βελτιωθεί οι διαγνωστικές μέθοδοι. Για το λόγο αυτό, πρέπει να γίνουν πολλά ακόμα, έτσι ώστε να υπάρχει γρήγορη διάγνωση και προεγχειρητική και μετεγχειρητική σταδιοποίηση. Με τον τρόπο αυτό, επιλέγεται η καταλληλότερη αντινεοπλασματική θεραπεία και η εξατομικευμένη μεταθεραπευτική παρακολούθηση. Οι επιστήμονες αναδεικνύουν όλο και πιο πολύ τη σημασία των βιοδεικτών στην αντιμετώπιση του ΚΠΕ και στην αναβάθμιση της στοχευμένης θεραπείας του<sup>289</sup>.

Ενώ τα γονίδια APC και E2F1 έχουν μελετηθεί μεμονωμένα αρκετά τα τελευταία χρόνια, ταυτόχρονα και σε συνδυασμό με το γονίδιο P14ARF και το KI67 δεν έχουν απαντηθεί σε κάποια έρευνα σε παγκόσμια κλίμακα. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι, προσπαθώντας με μεθοδικότητα μέσα από ερευνητικές διαδικασίες στο εργαστήριο και παρατήρηση με οπτικά μικροσκόπια, να αποδείξει την όποια σχέση υπάρχει μεταξύ των εν λόγω γονιδίων.

##### II. Σπουδαιότητα

Ο ΚΠΕ αποτελεί βασική αιτία θανάτου, όσο αναφορά τον καρκίνο, σε παγκόσμια κλίμακα. Από τη στιγμή που αυξάνονται συνεχώς οι περιπτώσεις ΚΠΕ, προβάλλεται επιτακτική η ανάγκη αναζήτησης εργαλείων τόσο πρόβλεψης όσο και πρόγνωσης, στα οποία εργαλεία θα επιτραπεί η χρήση νέων διαγνωστικών μοριακών τεστ. Η έκφραση κάποιων γονιδίων μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη πρόγνωση του ΚΠΕ. Μάλιστα σε έρευνες που έχουν γίνει μελετώντας την τελική επιβίωση ασθενών με ΚΠΕ, κατέληξαν ότι σχετίζονται 6.487 γονίδια. Τα γονίδια αυτά δραστηριοποιούνται κυρίως σε

διάφορα μονοπάτια όπως αυτά της ενδοκυττάρωσης, του προσανατολισμού, της συναρμογής του hnRNA σε mRNA με τη βοήθεια των συρραπτοσωμάτων, της σηματοδότησης Wnt και της ενδιάμεσης πρωτεόλυσης της ουβικουιλίνης. Η τελευταία πρωτεΐνη μάλιστα, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη δραστηριότητα και θέση οποιασδήποτε πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο όπως και για το μαρκάρισμά και την τελική αποικοδόμησή τους. Ως εκ τούτου οι ασθενείς από νωρίς μπορεί να διακριθούν σε κατηγορίες υψηλού και χαμηλού κινδύνου, ώστε να σχεδιαστεί μια στρατηγική αντιμετώπισης τους σε μια θεραπευτική κατεύθυνση που είναι από πριν γνωστή. Κάποια κέντρα χρησιμοποιούν προγνωστικά μοντέλα π.χ. 7 γονιδίων σαν βιοδείκτες, ως απόδειξη για την έναρξη και εξέλιξη του ΚΠΕ<sup>290</sup>.

### III. Διατύπωση γενικού σκοπού

Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι για το 2014 όσο αναφορά τις ηλικίες από 80 έτη και πάνω το 1/3 των ανθρώπων πέθανε από ΚΠΕ με ποσοστά 29% στους άντρες και 43% στις γυναίκες. Το παράδοξο είναι ότι μέχρι την ηλικία των 80 ετών παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο. Δηλαδή, οι άντρες εμφανίζουν ένα ποσοστό θανάτου πιο αυξημένο από αυτό των γυναικών με ποσοστό 30-40%. Επιδημιολογικά εντοπίζονται διάφορες διακυμάνσεις. Στις γυναίκες ηλικίας ως 50 έτη, 26% του ΚΠΕ εντοπίζεται στο ανιόν τμήμα του εντέρου ενώ σε ηλικία άνω των 80 το ποσοστό αυτό διαμορφώνεται σε 56%. Τα υψηλότερα ποσοστά εντοπισμού και θνησιμότητας παρατηρούνται σε εγχρώμους ανθρώπους (29,4%), την ίδια στιγμή που Ασιάτες και κάτοικοι των νησιών του Ειρηνικού έχουν αντίστοιχα ποσοστά της τάξεως του 13,1%. Την ίδια στιγμή η λευκή-μη ισπανική φυλή, έχει ποσοστό εμφάνισης ΚΠΕ 19,2%.

Πέρα από τη μεγάλη διακύμανση επιδημιολογικών στατιστικών μεγεθών και την πρωτογενή πρόληψη που αφορά σε συγκεκριμένες συνήθειες, ως προς τον τρόπο ζωής, διατροφής, αποφυγή καπνίσματος και άλλα, ο έγκαιρος προληπτικός εργαστηριακός έλεγχος, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο. Υπάρχουν προγράμματα Δημόσιας Υγείας, τα οποία μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη ορισμένων καρκίνων ή να αυξήσουν την πιθανότητα ενός καρκίνου να θεραπευτεί. Ως εκ τούτου, η πρόληψη του ΚΠΕ είναι δυνατή. Σύμφωνα με την American Cancer Society οι συστάσεις για την πρόληψη και έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, αφορούν σε



εξετάσεις οι οποίες θα πρέπει να επαναλαμβάνονται σε τακτικά χρονικά διαστήματα αναλόγως της ηλικίας. Ο στόχος των ερευνητών είναι, στο άμεσο μέλλον, να υπάρχει ένα γενετικό τεστ το οποίο να βασίζεται στη συσχέτιση των εν έρευνα γονιδίων<sup>291</sup>.

## 7.2 Υλικό και Μέθοδος

Υλικό για την παρούσα μελέτη αποτέλεσαν ιστοί ασθενών με ΚΠΕ. Κατόπιν χειρουργικής επέμβασης, ως αντιμετώπισης την ασθένειας, λήφθηκε ιστός σε παραφίνη από το παρασκεύασμα. Συνολικά λήφθηκαν 103 δείγματα, από τα οποία κατάφεραν να χρησιμοποιηθούν τα 88. Καθ' όλη τη διάρκεια της συλλογής των δεδομένων τα κομμάτια ιστών διατηρούντο σε ειδικό ψυγείο (-73°C) του οποίου η παροχή ρεύματος συνδεόταν με αυτόματη γεννήτρια. Μελετήθηκαν με διαφορετικές τεχνικές, η πιο βασική εκ των οποίων αυτή της ανοσοϊστοχημείας. Τέλος πραγματοποιήθηκε ψηφιακή μικροφωτογράφιση για εξαγωγή συμπερασμάτων από συσχέτιση δεδομένων.

### IV. Περιγραφή σχεδιασμού

## **ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ** **(Immunohistochemistry, IHC)**

Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση μη φυσιολογικών κυττάρων, όπως αυτά που εντοπίζονται σε καρκινικούς όγκους. Παράλληλα είναι σημαντικό εργαλείο στη βασική έρευνα για τον χαρακτηρισμό του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης μιας πρωτεΐνης, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός οργανισμού. Πριν από τη χρήση ενός αντισώματος, προσδιορίζεται η βέλτιστη αραίωση στην οποία μπορεί αυτό να χρησιμοποιηθεί. Ο προσδιορισμός της κατάλληλης αραίωσης ενός αντισώματος πραγματοποιείται με δοκιμές του αντιορού - σε διάφορες αραιώσεις - σε ιστούς γνωστούς για την περιεκτικότητά τους, στο υπό μελέτη αντιγόνο, εφαρμόζοντας την ίδια τεχνική που θα ακολουθηθεί στο πειραματικό πρωτόκολλο. Στην παρούσα διδακτορική μελέτη, η όλη διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται εκτενώς παρακάτω.

## **1η ΗΜΕΡΑ**

### **1. Αποπαραφίνωση**

Λιώσιμο παραφίνης. Τα πλακάκια τοποθετούνται πάνω στην θερμική πλάκα η οποία έχει ζεσταθεί στους 60°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία λιώνει η παραφίνη και πραγματοποιείται μια πρώτη αντιγονική αποκάλυψη (χρόνος 20)'. Πραγματοποιείται έλεγχος για το αν έχει όντως λιώσει η παραφίνη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θάλαμος επώασης-κλίβανος στους 60°C.

### **2. Ενωδάτωση ιστού και 1<sup>η</sup> αποκάλυψη ιστού**

- Ξυλόλη I                    5 min (ξέπλυμα παραφίνης)
- Ξυλόλη II                    10 min
- Αιθανόλη 100% I        5 min (ξέπλυμα ξυλόλης)
- Αιθανόλη 100% II       10 min
- Αιθανόλη 96%            10 min
- Αιθανόλη 80%            5 min
- Αιθανόλη 70%            3 min
- Αιθανόλη 50%            3 min

Παρασκευάζεται διάλυμα TBS με τελικό όγκο 500ml. Στόχος μας η συγκέντρωση TBS του νέου διαλύματος να υπο-εικοσαπλασιαστεί. Αναμειγνύονται για το λόγο αυτό 25 ml TBS + 475ml dH<sub>2</sub>O = 500 ml Δ/τος TBS. Για 1000 ml διαλύματος → 50 ml TBS και 950 ml dH<sub>2</sub>O.

Σε μια κιβέτα γίνεται έγχυση TBS και τοποθετούνται τα πλακάκια. Γίνεται έκπλυση μια φορά γρήγορα και άλλη μια φορά για 5'. Κατά τη διάρκεια των πλύσεων τα πλακάκια είναι εμβαπτισμένα σε υγρό συνεχώς, έτσι ώστε οι τομές να παραμένουν ενυδατωμένες. Όταν βγαίνουν τα πλακάκια από το ένα διάλυμα, τοποθετούνται στο επόμενο, για 5' και χύνεται το πρώτο διάλυμα. Η διάρκεια και ο αριθμός των πλύσεων που πραγματοποιούνται κάθε φορά είναι αντιστρόφως ανάλογα του αντισώματος. Όσο πιο δυνατά προσδένεται το αντίσωμα, τόσο πιο πολλές πλύσεις γίνονται.

### **3. Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων / Διάσπαση δεσμών από μονιμοποίηση**

Η αποκάλυψη των τομών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χρησιμοποιώντας φούρνο μικροκυμάτων είτε ατμοποιητή - Steamer και με ταυτόχρονη χρήση χημικών διαλυμάτων που είναι τα Κιτρικά ή το EDTA.

- Με διάλυμα κιτρικών 10mM pH=6.00 1x (Το stock είναι 10x, άρα 50 ml κιτρικά και 450 ml d H<sub>2</sub>O για 500ml Δ/τος). Απομακρύνεται το TBS από το μπανάκι και γρήγορα, για αποφυγή αφυδάτωσης, αντικαθίσταται με διάλυμα Κιτρικών.
- EDTA- είναι ασταθές χημικό και αλλάζει εύκολα το Ph του Δ/τος. 1mM pH=8,0 (Το stock είναι 0,5 M pH=8.00. Τοποθετούνται 550λ stock EDTA σε 250 mL dH<sub>2</sub>O και ρυθμίζεται το pH με HCl).

Πάντα γίνεται μέτρηση του Ph των νέων Δ/των. Αν το Ph είναι αυξημένο τοποθετείται HCL σε πολύ μικρή ποσότητα και χρήση μόνο υπό αρνητική πίεση. Σε περίπτωση που το Ph είναι μειωμένο τοποθετείται NaOH. Εν συνεχεία γίνεται τοποθέτηση σε φούρνο μικροκυμάτων 5' ζέσταμα δ/τος και 5 φορές για 5' στα 700W (ή t<sub>ολ</sub>=25). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σταδιακά συμπληρώνονται κιτρικά για να μην στεγνώσει ο ιστός, λόγω εξάτμισής τους. Την ίδια χρονική στιγμή και για να μη στεγνώσει ο ιστός, τοποθετείται μαζί ένα πλαστικό λεκανάκι με νερό βρύσης. Κατόπιν, τοποθετούνται οι κιβέτες σε λεκανάκι με H<sub>2</sub>O βρύσης και αφήνονται να κρυώσουν για περίπου 20' (για πιο γρήγορα αποτελέσματα παραμονή στο cold room). Ξεπλένονται από τα κιτρικά, αποχύνοντας τα κιτρικά και προσθέτοντας TBS (1 γρήγορο και ένα για 5').

### **4. Αδρανοποίηση ενδογενούς υπεροξειδάσης**

- Καθαρίζεται το πλακάκι από κάτω και περιμετρικά της τομής και προσθέτονται 50-100 λ (ανάλογα με την τομή) υπεροξειδίου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) από το kit. Διαφορετικά, αδειάζεται το TBS από την κιβέτα και γεμίζεται με υπεροξειδίου (Το stock είναι 30% και το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι 3%,

οπότε γίνεται 10 φορές αραίωση). Για 50 ml διαλύματος ( $V_{ολ}$  κιβέτας) → 5 ml  $H_2O_2$  και 45 ml  $dH_2O$ . Ο χρόνος επώασης είναι 12-15' (συνήθως 15).

**ΠΡΟΣΟΧΗ!!!** Όλα γίνονται σε σκοτάδι γιατί το  $H_2O_2$  είναι φωτοευαίσθητο (τοποθέτηση σε ντουλάπι ή καπάκι σε κιβέτα).

- Ξέπλυμα με TBS, μια φορά γρήγορα και μια φορά για 5'.

### **5. Ετοιμασία 1γενούς Ab**

Αυτό το στάδιο εξαρτάται από το αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί και την ενδεικτική αραίωση του (το αντίσωμα βρίσκεται στους 4°C ή -20°C, το αναφέρει ο κατασκευαστής). Η αραίωση γίνεται σε TBS 1x, για αραίωση 1:1000 → 1 λ Ab σε 999 λ TBS (μπορεί να χρησιμοποιηθεί και goat serum σαν μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων, συνήθως σε διάλυση 1/20-1/40). Γίνεται ανάδευση Vortex στο μπουκαλάκι με το αντίσωμα και εν συνεχεία αραίωση σε ένα erpendorf και γίνεται εκ νέου ανάδευση Vortex. Δεν παραμένει το αντίσωμα για πολλή ώρα εκτός ψυγείου/κατάψυξης για να μην μετουσιωθεί.

### **6. Μπλοκάρισμα μη ειδικού σήματος (Blocking)**

Στο σκοτεινό κουτί, που θα χρησιμοποιηθεί, απλώνεται στη βάση χαρτί και μουσκεύεται με  $H_2O$ . Λαμβάνεται κάθε πλακάκι ξεχωριστά και αφού σκουπιστεί καλά, κυρίως γύρω από την τομή για να μην υπάρξουν τυχών αλλοιώσεις, τοποθετείται επάνω στην τομή 50-100 λ Ultra-V Block (ανάλογα με την τομή) και επωάζεται για 7'. Προσοχή να μην στεγνώσουν οι τομές. Εν συνεχεία, το πλακάκι τινάζεται ελαφρά και εμβαπτίζεται σε κιβέτα με TBS. Κατόπιν γίνεται ένα ξέπλυμα γρήγορο με TBS και ένα πλύσιμο για 5'.

### **7. Προσθήκη αραιωμένου Ab**

Στεγνώνεται το πλακάκι πάνω σε χαρτί για να φύγει η μεγάλη ποσότητα του Ultra V block, καθαρίζεται και προστίθεται 50-100 λ Ab. Επώαση για 1h RT (θερμοκρασία δωματίου) ή overnight για 16 ώρες στους 4°C.

## **2η ΗΜΕΡΑ**

Ξέπλυμα με TBS 1x (2 γρήγορα και 1x5 min).

### **1. Επώαση με 2γενές αντίσωμα**

Το πρωτογενές ετοιμάζεται ανάλογα με το αντίσωμα. Το αντίσωμα από το δευτερογενές ονομάζεται PEA (Primary Antibody Enhancer). Σκουπίζεται το πλακάκι και προστίθεται με τον ίδιο τρόπο primary Ab enhancer από το kit για 10 min RT. Εναλλακτικά τοποθετείται Secondary Antibody-biotin conjugated (anti-Rabbit/anti-Rat) με αραιώση 1/200 TBS και επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C.

**2.** Ξέπλυμα με TBS 1x (2 γρήγορα και 1x5 min).

**3.** Επώαση με HRP Polymer για 15. Εναλλακτικά HRP-streptavidin conjugated 1/200 σε TBS 30' 37o C. Ξεπλένεται με TBS δυο φορές (1+1). ΠΡΟΣΟΧΗ!!!! Αυτό το στάδιο γίνεται σε σκοτάδι γιατί το ένζυμο της υπεροξειδάσης είναι φωτοευαίσθητο.

**4.** Ξέπλυμα με TBS 1x (2 γρήγορα και 1x5 min).

**5.** Ετοιμάζεται αραιωμένο DAB. Υπάρχουν 2 είδη DAB, το καθαρό (DAB Chromogene-SOS καρκινογόνο) και το DAB substitute, το οποίο είναι διάλυμα με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Αναμιγνύεται ο όγκος σε erpendorf, με αναλογία 1 DAB crom/100 DAB sub. Χρώση με DAB (1 DAB : 100 substrate) από kit και παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Αυτό το στάδιο απαιτεί σκοτάδι και επίσης το DAB είναι εξαιρετικά καρκινογόνο.

**6.** Αδρανοποίηση του DAB με νερό βρύσης.

**7.** Χρώση με αιματοξυλίνη 1:2 (εμβάπτιση για λίγο και μετά κάτω από τρεχούμενο νερό)

**8.** Αφυδάτωση (Αντίστροφη ενυδάτωσης). Προσοχή το πλακάκι να μην κάνει νερά αλλιώς θα η εικόνα θα είναι θολή στο μικροσκόπιο.

Αιθανόλη 50%      3 min

Αιθανόλη 70%      3 min

Αιθανόλη 80%	5 min
Αιθανόλη 96%	10 min
Αιθανόλη 100%	15 min
Ξυλόλη I	5 min (ξέπλυμα παραφίνης)
Ξυλόλη II	10 min

9. Κλείσιμο με κόλλα DPX. Τοποθετείται μια σταγόνα στο πλακάκι και εφαρμόζεται η καλυπτρίδα. Η κόλλα είναι διαλυτή στην ξυλόλη.

### Σημειώσεις

- Πάντα οι ιστοί να είναι σε υγρό περιβάλλον για να μη στεγνώσουν.
- Τα πλακάκια είναι λυσινοποιημένα (+ φορτισμένα) για να κολλήσει ο ιστός πάνω στο πλακάκι.
- Το TBS, τα κιτρικά και τα διαλύματα του kit φυλάσσονται στους 4°C (cold room).
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DAB, HRP φυλάσσονται σε σκούρες φιάλες ή καλυμμένα με αλουμινόχαρτο.
- Σε περίπτωση που υπάρχει έντονο background τότε:
  - a) μειώνεται η συγκέντρωση του Ab ή
  - b) αυξάνεται ο χρόνος blocking ή
  - c) μειώνεται ο χρόνος αποκάλυψης ή
  - d) μειώνεται ο χρόνος επώασης του 1γενούς Ab

Κάθε φορά γίνεται αλλαγή και εξετάζεται μια μόνο συνθήκη!
- Μπορούν να παραμείνουν τα πλακάκια μετά την ενυδάτωση σε dH<sub>2</sub>O overnight ή μετά την αποκάλυψη σε TBS 1x. (Γενικά μπορούν να μείνουν παραπάνω ώρα σε οποιοδήποτε στάδιο έχει TBS).

### V. Προστασία δικαιωμάτων υποκειμένων

Όσον αφορά τη νομοθεσία και τα δικαιώματα των υπό μελέτη ιστών των ασθενών ισχύουν τα παρακάτω τα οποία αναφέρονται και στο βιβλίο Επιτροπή Ερευνών του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, 2η Έκδοση, 2010.

- I. Καμία έρευνα, βιολογική, ιατρική ή κοινωνική με αντικείμενο τον άνθρωπο δεν μπορεί να διεξαχθεί χωρίς τη συναίνεσή του μετά από προηγούμενη ενημέρωσή του για το σκοπό, την έκταση και τους κινδύνους που ενδεχομένως συνεπάγεται, σύμφωνα με το άρθρο 4 του Κεφαλαίου Α του παρόντος Κώδικα.
- II. Δεν επιτρέπεται, κατά την έρευνα ή με πρόσχημα την έρευνα, η οικονομική εκμετάλλευση του ανθρώπινου σώματος, από τα όργανα ως το γονιδίωμα του κυττάρου, καθώς και οποιαδήποτε οικονομική εκμετάλλευση των προσώπων που υπόκεινται σε αυτήν, από τους ερευνητές. Οικονομική ή άλλης φύσης αμοιβή αυτών των προσώπων δεν αποκλείεται, εκτός αν πρόκειται για την τέλεση πράξεων εκτός συναλλαγής κατά την ισχύουσα νομοθεσία.
- III. Οι ερευνητές οφείλουν να τηρούν απαρεγκλίτως πριν, κατά και μετά την έρευνα την ισχύουσα νομοθεσία για την προστασία των προσωπικών δεδομένων των ανθρώπων που αποτελούν αντικείμενο της έρευνας (ν. 2472/1997, 2819/2000, 2915/2001, 3235/2004, 3471 /2006, ή όπως θα ισχύουν εκάστοτε).
- IV. Σε καμία περίπτωση η έρευνα καθ' αυτήν δεν μπορεί να αποτελεί λόγο που να νομιμοποιεί εις την τέλεση αξιόποινης πράξης.
- V. Στις βιολογικές και ιατρικές έρευνες οι ερευνητές οφείλουν επιπλέον να τηρούν τον εκάστοτε ισχύοντα Κώδικα Ιατρικής Δεοντολογίας (ν. 3418/2005), καθώς και τους εκάστοτε ισχύοντες ειδικούς νόμους για τις μεταμοσχεύσεις ανθρώπινων ιστών και οργάνων (ν. 2737/1999, π. δ. 26/24.3.2008), την βιοϊατρική έρευνα (ν. 2619/1998, Πρόσθετο Πρωτόκολλο της Σύμβασης για τη βιοϊατρική έρευνα και Οικουμενική Διακήρυξη της UNESCO για το ανθρώπινο γονιδίωμα και τα δικαιώματα του ανθρώπου), τις κλινικές μελέτες στα φάρμακα (Υ. Α. ΔΥΓ/89292/2003, Οδηγία 2005/28), την ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ν. 3089/2002, 3305/2005), τον εκάστοτε ισχύοντα Κώδικα Νόμων για τα Ναρκωτικά (ν.3459/2006), τη νομοθεσία για τη

φαρμακοδιέγερση (ντόπιγκ) (ν. 2725/1999, 3057/2002, 3516/2006) και τις εκάστοτε ισχύουσες υγειονομικές διατάξεις.

- VI. Στα εργαστήρια στα οποία διενεργείται έρευνα σε μικροοργανισμούς - μεταξύ των οποίων και σε γενετικά τροποποιημένους - που είναι δυνατό να προκαλέσουν οποιαδήποτε μόλυνση, αλλεργία ή τοξικότητα, ή μπορούν να αναπαράγονται ή να μεταφέρουν γενετικό υλικό, πρέπει να τηρούνται οι διατάξεις της Οδηγίας 2000/54/ΕΚ .
- VII. Στις κοινωνικές έρευνες οι ερευνητές οφείλουν να σέβονται τις πολιτιστικές και ατομικές διαφορές ρόλων, συμπεριλαμβανομένων και όσων οφείλονται στην ηλικία, στο φύλο, στη φυλή, στη μειονότητα, στην εθνική προέλευση, στη θρησκεία, στις σεξουαλικές προτιμήσεις, στην αναπηρία, στη γλώσσα και στο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο. Οφείλουν να τηρούν σε κάθε περίπτωση την εκάστοτε ισχύουσα νομοθεσία για την ίση μεταχείριση (ν. 3625/2007), το ρατσισμό (ν. 927/1979, 3304/2005), τους μετανάστες και τους αλλοδαπούς (ν. 3536/2007, 3613/2007).

Τέλος σύμφωνα με τη σύμβαση του Οβιέδο, Ν.4/4/1997, όλα τα κράτη του Συμβουλίου της Ευρώπης, τα λοιπά κράτη και τα μέχρι τούδε Συμβαλλόμενα Μέρη της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, ορίζουν τη λήψη όλων των αναγκαίων μέτρων για την προάσπιση της ανθρώπινης αξιοπρέπειας και των θεμελιωδών δικαιωμάτων και ελευθεριών του ατόμου σε σχέση με την εφαρμογή της Βιολογίας και της Ιατρικής. Δίδεται ιδιαίτερη έμφαση ότι επέμβαση σε θέματα υγείας μπορεί να υπάρξει μόνον αφού το ενδιαφερόμενο πρόσωπο δώσει την ελεύθερη συναίνεσή του, κατόπιν προηγούμενης σχετικής ενημέρωσής του. Το πρόσωπο αυτό θα ενημερώνεται εκ των προτέρων καταλλήλως ως προς το σκοπό και τη φύση της επέμβασης, καθώς και ως προς τα επακόλουθα και κινδύνους που αυτή συνεπάγεται. Το ενδιαφερόμενο πρόσωπο μπορεί ελεύθερα και οποτεδήποτε να ανακαλέσει τη συναίνεσή του.

Εξετάσεις που προβλέπουν την εμφάνιση γενετικών νόσων ή που χρησιμοποιούνται είτε για την αναγνώριση του υποκειμένου ως φορέα γονιδίου υπεύθυνου για νόσο είτε για την ανίχνευση γενετικής προδιάθεσης ή δεκτικότητας για νόσο, επιτρέπεται να διενεργούνται μόνο για λόγους υγείας ή για επιστημονική έρευνα που σχετίζεται με λόγους υγείας, και υπό την προϋπόθεση της κατάλληλης γενετικής συμβουλευτικής. Κάθε επέμβαση που



αποσκοπεί στην τροποποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι επιτρεπτή μόνο για προληπτικούς, διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς και μόνον εφόσον δεν αποσκοπεί στο να εισαγάγει οποιαδήποτε τροποποίηση στο γονιδίωμα τυχόν απογόνων. Όταν κατά τη διάρκεια επέμβασης αφαιρείται οποιοδήποτε τμήμα του ανθρωπίνου σώματος, επιτρέπεται η αποθήκευση και χρησιμοποίησή του για σκοπούς άλλους από αυτούς για τους οποίους αφαιρέθηκε, μόνον εφόσον αυτό γίνεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που αφορούν στην πρέπουσα ενημέρωση και συναίνεση.

ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΣΕ ΜΗΝΕΣ															
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48
ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΘΕΜΑΤΟΣ	■															
ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΥΠΟΤΡΟΦΙΑΣ	■	■														
ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΙΣΤΟΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ E2F1											■	■	■			
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ APC												■	■	■		
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ Ki67													■	■		
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ P14ARF															■	
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΛΑΚΙΔΙΩΝ												■	■	■	■	
ΜΙΚΡΟΦΩΤΟΓΡ/ΣΗ ΠΛΑΚΙΔΙΩΝ															■	
ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ															■	■
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ															■	■

## VI. Χρονοδιάγραμμα (διάγραμμα Gantt)

Μια από τις δημοφιλέστερες τεχνικές προγραμματισμού έργου, που είναι και απλή, είναι το διάγραμμα Gantt. Ονομάστηκε έτσι από τον Αμερικανό μηχανολόγο μηχανικό Henry Gantt (1869 – 1919), ο οποίος ήταν ο πρώτος που το επινόησε και το χρησιμοποίησε. Το διάγραμμα Gantt είναι ένα οριζόντιο ραβδόγραμμα που απεικονίζει στην ουσία την σχέση των διαφορετικών δράσεων του έργου, μέσα στον χρόνο. Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την χρονική μελέτη της διατριβής. Πιο συγκεκριμένα εμφανίζεται σε έναν πίνακα ο προγραμματισμός των μελλοντικών ενεργειών, η διάθεση των πιθανών πόρων και η διαχείριση της πορείας των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας όπως επίσης και πιθανή ημερομηνία ολοκλήρωσης της διατριβής. Ελέγχοντας όλες τις δραστηριότητες οποιαδήποτε στιγμή μπορούν να λάβουν χώρα οι απαραίτητες ενέργειες, ούτως ώστε να μη χρειαστεί να ξεφύγει χρονικά κάποιο από τα επί μέρους τμήματα.

Για να σχεδιαστεί το διάγραμμα Gantt της συγκεκριμένης διατριβής, πρέπει αρχικά να απαριθμηθούν όλες οι δραστηριότητες (κάθετος άξονας) και οι αντίστοιχες διάρκειές τους. Στη συνέχεια γίνεται η χάραξη των δραστηριοτήτων πάνω σε ένα έντυπο γραφικών παραστάσεων, σχεδιάζονται όλες οι δραστηριότητες και τέλος παρουσιάζεται η ανάλυση. Στον οριζόντιο άξονα του διαγράμματος τοποθετείται ο χρόνος σε κατάλληλες υποδιαιρέσεις που να ταιριάζουν με τις ανάγκες και την χρονική διάρκεια της εκπόνησης.

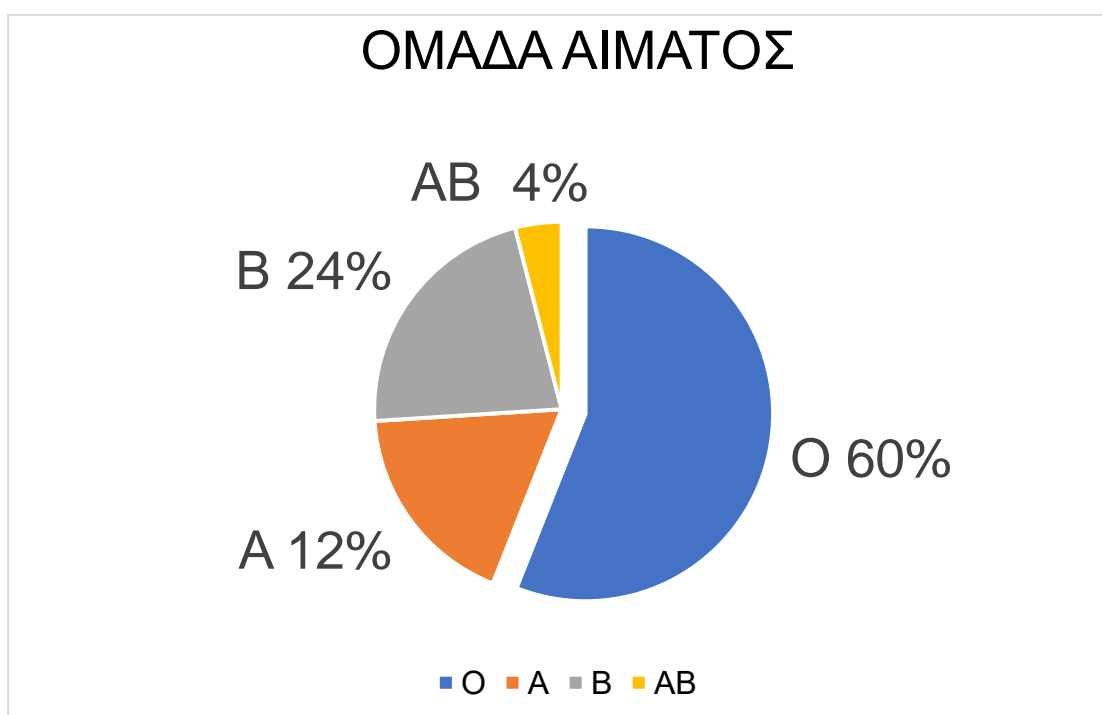
### I. Προϋπολογισμός

Μεγάλο ποσοστό των εξόδων για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής καλύπτεται από ληφθήσα υποτροφία του Κοινωφελούς Ιδρύματος Αλέξανδρος Ωνάσης. Τυχόν επιπλέον έξοδα αντιδραστηρίων, πλακιδίων ή τυχόν άλλου εξοπλισμού καλύπτονται από ιδίους πόρους. Η αγορά υλικών πραγματοποιείται μέσω εταιριών που προμηθεύουν με γραπτούς διαγωνισμούς το τμήμα Ιστολογίας του ΕΚΠΑ.

## 7.3 Ανάλυση

Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση συσχέτισης των Ομάδων Αίματος ABO με την ύπαρξη ΚΠΕ. Η συλλογή

δεδομένων διήρκησε από τον Ιανουάριο του 2017 μέχρι και τον Αύγουστο του 2021. Συνολικά 199 ασθενείς συμμετείχαν στην μελέτη και τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά. Στατιστικά είχαμε 50.8% ομάδα αίματος O, 29.6% ομάδα αίματος A, 13.1% ομάδα αίματος B και 6.5% ομάδα αίματος AB<sup>292</sup>. Σε μια αντίστοιχη μεγάλης κλίμακας έρευνα που έγινε το 2012 σε 1.620 ασθενείς διαπιστώθηκε η ποσοστιαία ανάλυση 45% ομάδα αίματος A, 31.4% ομάδα αίματος O, 16.4% ομάδα αίματος B και 7.2% ομάδα αίματος AB<sup>293</sup>.



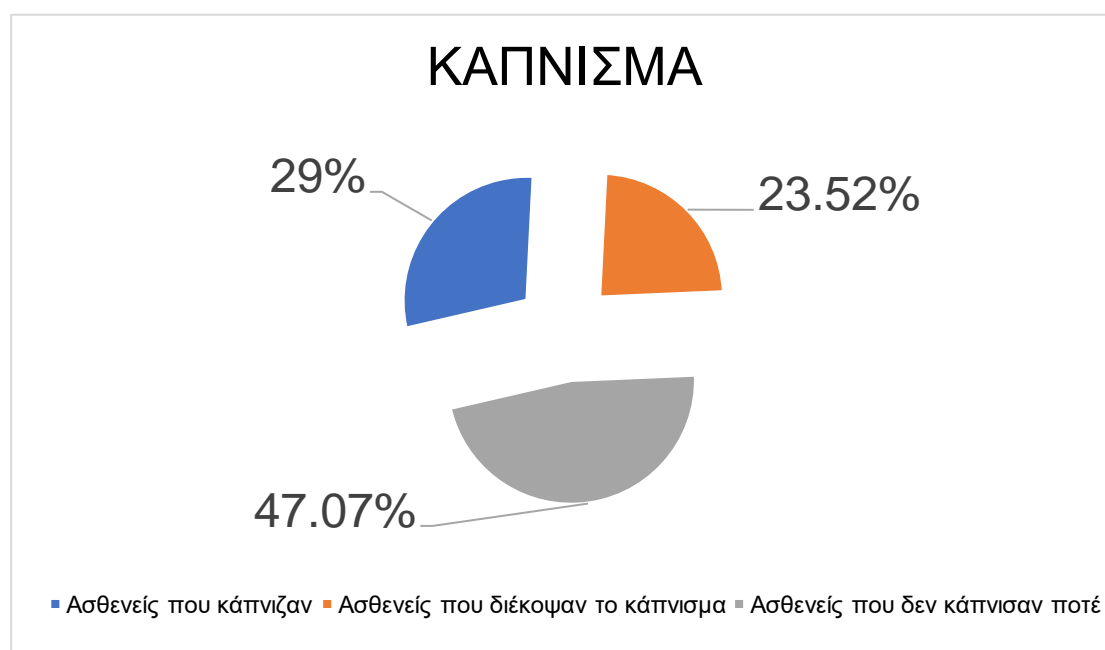
**Διάγραμμα 1:** Ποσοστιαία εμφάνιση ομάδας ABO στον ΚΠΕ.

Στην παρούσα μελέτη τα ποσοστά κυμαίνονται σε ελαφρώς διαφορετικές τιμές. Έτσι στατιστικά έχουμε 60% ομάδα αίματος O, 12% ομάδα αίματος A, 24% ομάδα αίματος B και 4% ομάδα αίματος AB. Συμπερασματικά υπάρχει στατιστική συσχέτιση μεταξύ του είδους των ομάδων αίματος ABO και της ύπαρξης ΚΠΕ ( $p=0.001$ ).

Μεταξύ των άλλων, σε αυτήν την μελέτη, έγινε προσπάθεια ανάλυσης του ιστορικού καπνίσματος των ασθενών. Το ποσοστό ασθενών που κάπνιζαν υπολογίζεται στο 29,41%, ένα ποσοστό 23,52% είχε διακόψει το κάπνισμα, ενώ το 47,07% δεν είχε καπνίσει ποτέ στη ζωή του. Τα ποσοστά χρήζουν περεταίρω

ανάλυσης και μελέτης μιας και απόλυτα συμπεράσματα είναι δύσκολο να διεξαχθούν.

Από τη μία πλευρά έχουμε μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΚΠΕ που δεν καπνίζουν και από την άλλη ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί ΚΠΕ. Και αυτό διαπιστώνεται με πειράματα στο εργαστήριο, με έκθεση ποντικών σε καπνό τσιγάρου, για 2 ώρες καθημερινά για διάστημα 28 εβδομάδων. Στην ιστολογική ανάλυση επιβεβαιώνεται η εμφάνιση ΚΠΕ στο επιθήλιο του εντέρου<sup>294</sup>.

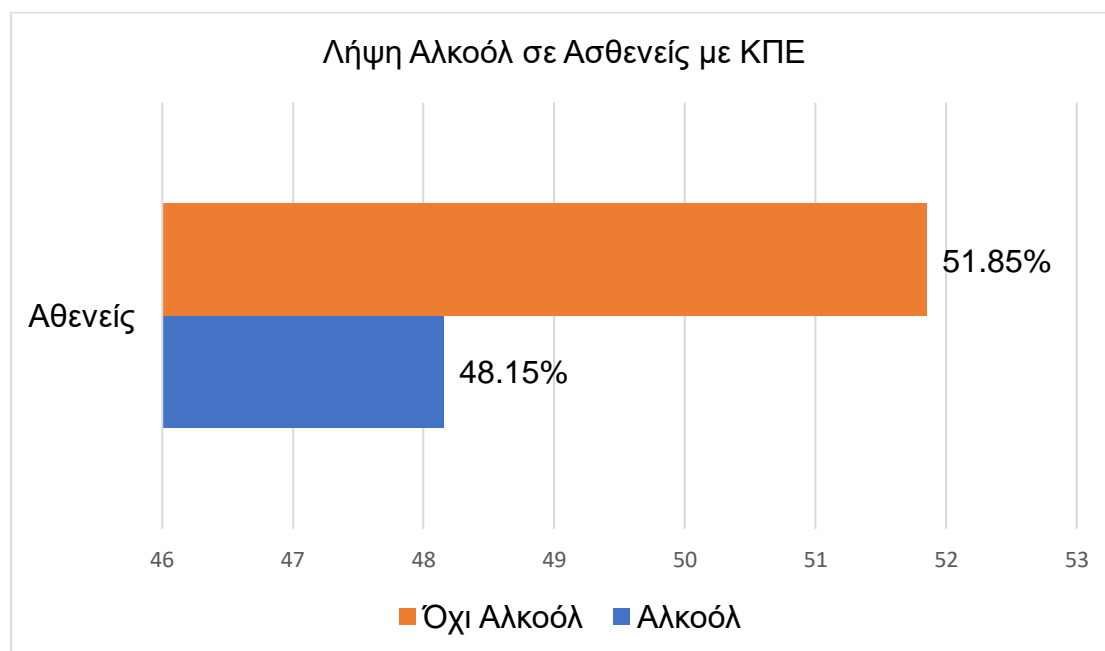


**Διάγραμμα 2:** Ποσοστιαία εμφάνιση καπνίσματος σε ασθενείς με ΚΠΕ.

Σε αντίστοιχη συλλογή δεδομένων σε 18.816 ασθενείς, τα ποσοστά καπνίσματος βρίσκονται στο 17,54% χωρίς να επηρεάζουν τη μελέτη ιδιαίτερα παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η περιοχή διαμονής και η σταδιοποίηση του καρκίνου. Αυτό όμως που σημειώνεται ως το πιο σημαντικό συμπέρασμα είναι ότι η θνησιμότητα είναι 4 φορές μεγαλύτερη στην ομάδα ασθενών που καπνίζει (52.1% & 13.8%, με  $p < 0.0001$ )<sup>295</sup>.

Οι ασθενείς της παρούσας μελέτης σε ποσοστό 48,15% καταναλώνουν αλκοόλ. Στη μέτρηση αυτή δεν έχει γίνει συσχέτιση με το φύλο, ενώ η ομάδα των ασθενών που δήλωσε περιστασιακή λήψη αλκοόλ ή σπάνια λήψη αλκοόλ, έχει συν-καταμετρηθεί στους ασθενείς χωρίς λήψη αλκοόλ. Όσον αφορά την ομάδα ασθενών με λήψη αλκοόλ, αυτή προσδιορίστηκε εξ αρχής στην

ημερήσια κατανάλωση 1-2 ποτήρια κρασί. Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η συστηματική κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ κατά 60%<sup>296</sup>. Ταυτόχρονα μια meta-analysis που αναλύει τη λήψη αλκοόλ σε ασθενείς, από το 1966 μέχρι και το 2013, παρουσιάζει μια πιθανότητα σχετικού κινδύνου (RR) της τάξεως του 1,21 για λήψη 56.5 gr αλκοόλ καθημερινά<sup>297</sup>.

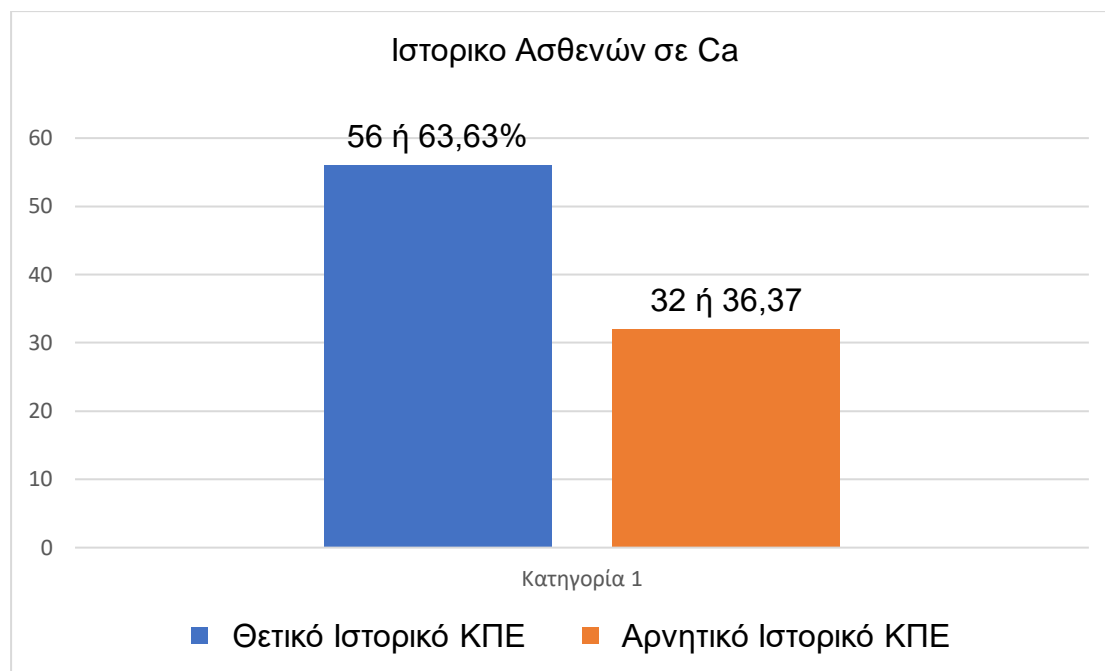


**Διάγραμμα 3:** Ποσοστιαία κατανάλωση Αλκοόλ σε ασθενείς με ΚΠΕ.

Σχεδόν ένας στους τέσσερις ασθενείς με ΚΠΕ έχουν οικογενειακό ιστορικό θετικό, όσον αφορά συγγενείς με Ca. Όταν κάνουμε αναφορά σε "οικογενειακό ιστορικό θετικό" τότε θα πρέπει να ισχύει κάποια από τις ακόλουθες προϋποθέσεις. Είτε θετικός τουλάχιστον ένας πρώτου βαθμού συγγενής (γονέας, αδερφός, παιδί) με διάγνωση κάτω των 60 ετών, είτε πολλαπλοί δευτέρου βαθμού συγγενείς (παππούδες, θείοι κ.τ.λ.)<sup>298</sup>. Όπως παρατηρούμε 56 ασθενείς εμφανίζουν θετικό ιστορικό σε Ca και μάλιστα το 68,18% αυτών το εμφανίζουν συγγενείς πρώτου βαθμού.

Στην καταγραφή ατομικού ιστορικού ξεχωρίζει το μικρό ποσοστό ασθενών που λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή για τον θυρεοειδή αδένα (5%). Μια μελέτη σε 139.426 ασθενείς που έγινε στην Ταιβάν έδειξε πως υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του ΚΠΕ και παθήσεων του θυρεοειδή αδένα. Με πιθανότητα σχετικού κινδύνου της τάξεως του 0,54 (υποθυρεοειδισμό) και 0,74

(υπέρθυρεοειδισμό)<sup>299</sup>. Επιπροσθέτως μια μελέτη του 2019 από τους Olga Rostkowska et al, ανάμεσα σε 3.054 άρθρα υποστηρίζει ότι η λήψη θυρεοειδοτρόπου ορμόνης σε σχέση με την ανάπτυξη ΚΠΕ, έχει μια πιθανότητα σχετικού κινδύνου της τάξεως του 0,60, καθώς αποδεικνύεται ότι παίζει ρόλο στην επιβράδυνση της καρκινογένεση του ΚΠΕ<sup>300</sup>.



**Διάγραμμα 4:** Ποσοστιαία εμφάνιση θετικού οικογενειακού ιστορικού σε Ca ασθενών με ΚΠΕ.

Το καρκινικό αντιγόνο-125 (CA-125) αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι είναι ένας ειδικός βιοδείκτης όσον αφορά τον καρκίνο των ωοθηκών. Πρόσφατα όμως σε μελέτες παρατηρήθηκε στον ορό ασθενών με αδenoκαρκίνωμα στομάχου, παχέος εντέρου και παγκρέατος. Μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα του CA-125 αυξάνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό όταν ο ασθενής παρουσιάζει ΚΠΕ. Στην μελέτη αυτή απαντάται στο 34,9% των ασθενών. Η μέτρηση του καρκινικού αντιγόνου CA-15-3 στον ορό χρησιμοποιείται για την διαχείριση ασθενών με καρκίνο του μαστού. Το φυσιολογικό εύρος για ένα υγιές άτομο είναι 30 U/mL ή λιγότερο. Σύμφωνα με το American Institute of Health, τα επίπεδα CA-15-3 είναι αυξημένα στο 76% περίπου των περιπτώσεων μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Στη συγκεκριμένη μελέτη εμφανίζονται σε ποσοστό 30,2%<sup>301</sup>.

## 7.4 Αποτελέσματα

### Κατανομή των νεοπλασιών σύμφωνα με την ιστοπαθολογική τους διάγνωση.

Συνολικά συμπεριλήφθηκαν 88 περιπτώσεις ασθενών με νεοπλασματική νόσο. Κατά τη διάγνωση εισόδου και τον ιατρικό φάκελο, υπήρχαν 35 ασθενείς με κακώθες νεόπλασμα παχέος εντέρου, 26 ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα ορθοσιγμοειδούς, 11 με αδenoκαρκίνωμα του ορθού, 13 με αδenoκαρκίνωμα τυφλού και 3 ασθενείς με κακώθες νεόπλασμα του ήπατος. Επισημαίνοντας ότι σε κάποιες περιπτώσεις η ένδειξη εισαγωγής δε συνάδει με το κύριο νόσημα μετά την χειρουργική επέμβαση και την ιστολογική εξέταση.

Ιστολογικά Ευρήματα	N	%
Αδenoκαρκίνωμα	59	58,66
Κακώθες νεόπλασμα	29	41,34
<b>Σύνολο</b>	<b>88</b>	<b>100</b>

**Πίνακας 1:** Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Αρκετές φορές έτυχε ο ασθενής να εισαχθεί στο Νοσηλευτικό Ίδρυμα με συγκεκριμένο ICD-10 και στην πορεία της νοσηλείας του, κατόπιν εργαστηριακών και απεικονιστικών εξετάσεων, να αλλάξει. Για το λόγο αυτό και εμφανίζεται διαφοροποίηση μεταξύ των ενδείξεων εισαγωγής και των αντίστοιχων χειρουργικών επεμβάσεων. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και οι χειρουργικές μέθοδοι παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

<b>Είδος Χειρουργείου</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Δεξιά ημικολεκτομή	27	30,68
Χαμηλή πρόσθια εκτομή	26	29,54
Σιγμοειδεκτομή	15	17,04
Δεξιά κολεκτομή	8	9,14
Αριστερή ημικολεκτομή	3	3,40
Εκτομή εγκάργιου κόλου	3	3,40
Κοιλιοπεριναϊκή εκτομή όρθου	3	3,40
Σφηνοειδής εκτομή όγκου ήπατος	3	3,40
<b>Σύνολο</b>	<b>N = 88</b>	<b>100</b>

**Πίνακας 2:** Είδος χειρουργείου.

### **Κατανομή επιδημιολογικών και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων**

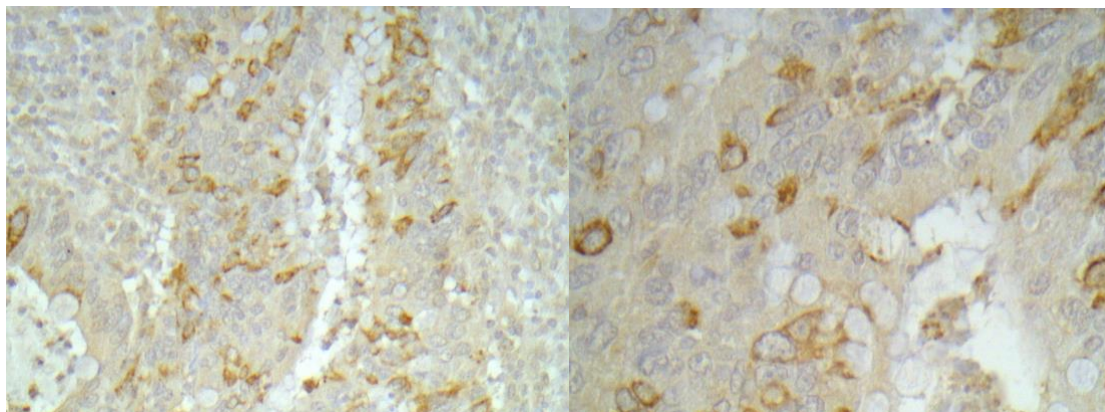
Η μέση ηλικία των συμμετεχόντων εκτιμάται ότι ήταν  $67,27 \pm 13,2$  (μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση) με εύρος 56 (34-90) έτη. Το 50% των συμμετεχόντων ήταν γυναίκες. Η πλειοψηφία των ασθενών (70,59%) δεν είχε κανένα εθισμό στον καπνό. Υπολογίζονται βέβαια τόσο οι ασθενείς που δεν κάπνιζαν όσο και αυτοί που έχουν διακόψει το κάπνισμα. Το 3,84% ήταν παχύσαρκοι και το 48,15% είχαν την τάση να καταναλώνουν αλκοόλ. Περίπου το 63,63% είχε τουλάχιστον ένα μέλος της οικογένειας με ιστορικό καρκίνου. Το σύμπτωμα και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη δεν περιλαμβάνονται. Η μειοψηφία των συμμετεχόντων εμφάνισε νεόπλασμα στο ήπαρ. Όλα τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν και διαχωρίστηκαν ως νεοπλασίες και αδενοκαρκινώματα. Το μέγεθος των κακοηθών νεοπλασμάτων κυμαίνεται από 4 έως 33 cm με μέσο όρο 5,50 cm.

### **Έκφραση του γονιδίου APC.**

Για τον εντοπισμό και τον προσδιορισμό του ποσοστού έκφρασης του γονιδίου APC διεξήχθη ανάλυση ανοσοϊστοχημείας σε διαφορετικούς τύπους νεοπλασμάτων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη (Εικ. 9a & 9b). Η θετική



έκφραση και η ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του γονιδίου APC που παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα 88 περιπτώσεων νεοπλασίας που μελετήθηκαν, περιγράφονται στους Πίνακες 3 και 4.



**(9a)**

**(9b)**

**Εικόνες 9a & 9b:** Μικροφωτογραφία της θετικής ανοσοέκφρασης των αντί-APC αντισωμάτων που αντιπροσωπεύεται από το καφετί χρώμα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων σε αδενώματα του παχέος εντέρου (ανοσοϊστοχημεία: (a) 200x και (a) 400x).

Ένταση	N (%)
Ασθενής	70 (79,55%)
Μέτρια	14 (15,91%)
Ισχυρή	4 (4,54%)

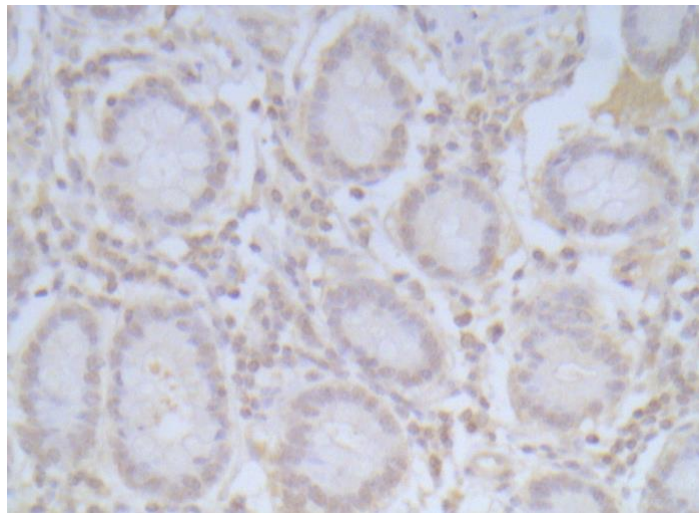
**Πίνακας 3:** Ένταση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του γονιδίου APC.

Θετικότητα	N (%)
< 5%	70 (79,55%)
5 έως 33%	14 (15,91%)
34 έως 75%	0 (0%)
> 75%	4 (4,54%)

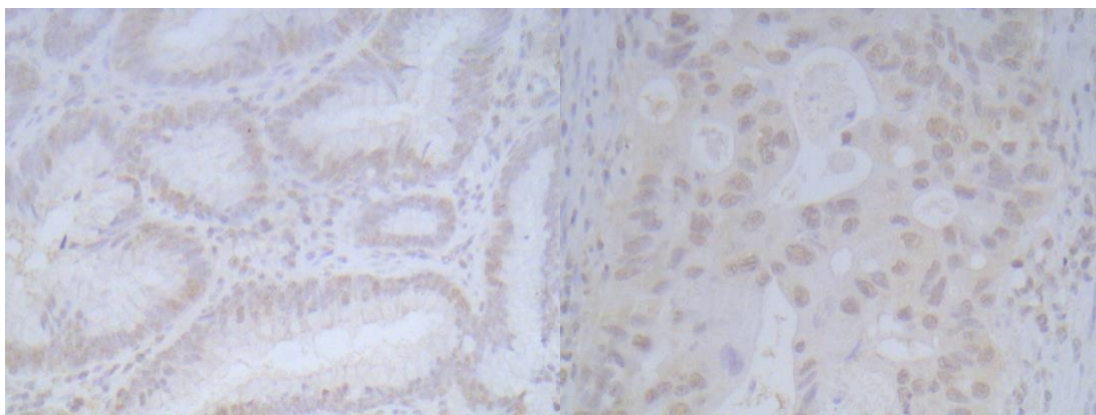
**Πίνακας 4:** Θετικότητα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης APC.

### Έκφραση του γονιδίου E2F1.

Η έκφραση του γονιδίου E2F1 (Εικ. 10a,10b & 10c) παρατηρήθηκε στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων που μελετήθηκαν. Συνολικά 26 από τους 88 ασθενείς εμφανίζουν θετική έκφραση του γονιδίου (29,54%). Υψηλή έκφραση του γονιδίου E2F1 βρέθηκε για το 4,54% των ασθενών (4 στους 88 ασθενείς), μέτρια έκφραση για το 6,82% των ασθενών (6 ασθενείς από τους 88), ασθενής έκφραση για το 18,18% των ασθενών (16 στους 88 ασθενείς), ενώ μηδενική έκφραση είχε το 70,46% των ασθενών (62 στους 88 ασθενείς). Όταν οι ίδιες περιπτώσεις αξιολογήθηκαν ανάλογα με το εάν είχαν υποστεί χρωματική αλλαγή, 28 περιπτώσεις (31,81%) εμφάνισαν χρωματική αλλαγή και 60 (68,19%) δεν υπέστησαν κάποια αλλαγή.



(10a)



(10b)

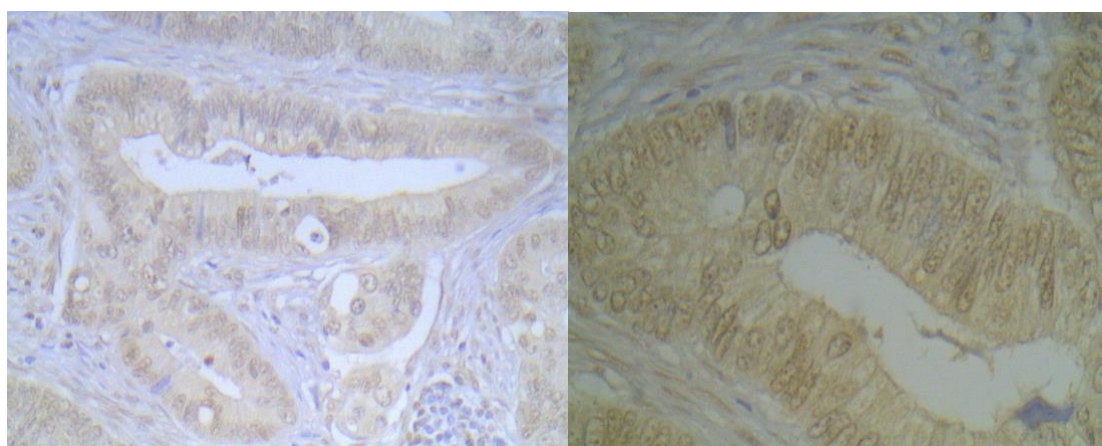
(10c)

**Εικόνα 10a, 10b & 10c:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το γονίδιο E2F1. Οι απεικονίσεις (a) 200x, (b) 200x και (c) 200x, αντιπροσωπεύουν τα παραδείγματα θετικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης (IHC).

#### **Έκφραση του γονιδίου P14ARF.**

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με βάση τη θετικότητα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και όχι με βάση την ένταση της έκφρασης, καθώς ήταν χαμηλή σε όλα τα θετικά δείγματα. Στο σύνολο των ασθενών βρέθηκε ότι σε 33 περιπτώσεις (37,5%) είχαν θετική έκφραση του γονιδίου P14ARF (Εικ. 11a & 11b), ενώ 55 περιπτώσεις (62,5%) έδειξαν αρνητική έκφραση του γονιδίου. Επιπλέον, δεν μπόρεσε να παρατηρηθεί κάποια σχέση μεταξύ των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών και τη θετικότητα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης, καθώς ο αριθμός δειγμάτων ήταν μικρός και ανεπαρκής για στατιστική ανάλυση.

**Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι 29 περιπτώσεις θετικής έκφρασης (32,95%) είχαν θετική έκφραση και του γονιδίου APC. Επιπλέον, 22 περιπτώσεις θετικής έκφρασης (25%) του γονιδίου P14ARF παρουσίασαν ταυτόχρονη θετική έκφραση με τα γονίδια E2F1 και APC.**



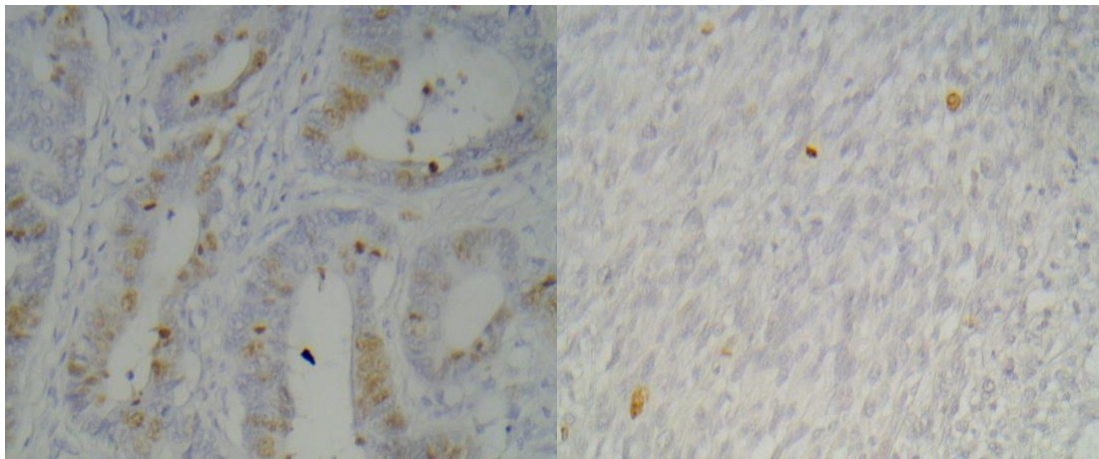
**(11a)**

**(11b)**

**Εικόνα 11a & 11b:** Αντιπροσωπευτική θετική ανοσοϊστοχημική χρώση καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου για το γονίδιο P14ARF, (a) 200x και (b) 400x.

### Έκφραση του γονιδίου Ki-67.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και σε αυτό το γονίδιο με βάση τη θετικότητα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και όχι με βάση την ένταση της έκφρασης. Συνολικά βρέθηκαν 33 περιπτώσεις ασθενών (37,5%) με θετική έκφραση του γονιδίου Ki-67 (Εικ. 12a & 12b), και 55 περιπτώσεις ασθενών (62,5%) με αρνητική έκφραση του γονιδίου. Δεν υπήρξε κάποια στατιστική συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών, όπως η ηλικία, το φύλο, ο τύπος του όγκου, ή η πρωτεύουσα θέση του όγκου, και της έκφρασης του γονιδίου Ki-67.



**(12a)**

**(12b)**

**Εικόνα 12a & 12b:** Θετική έκφραση του γονιδίου Ki-67 σε καρκινικά κύτταρα με χρήση ανοσοϊστοχημείας, (a) 200x και (b) 200x.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ΚΠΕ αποτελεί έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων, επομένως δείγματα ασθενών με παρόμοια παθολογικά χαρακτηριστικά μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικά αποτελέσματα σε εργαστηριακό επίπεδο. Τα τελευταία χρόνια, πολυάριθμες διαγνωστικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της υποτροπής και εξέλιξης του καρκίνου. Η συγκεκριμένη έρευνα απέδειξε μία συσχέτιση μεταξύ του ΚΠΕ και της θετικής έκφρασης των γονιδίων APC, E2F1, P14ARF και Ki-67. Η συσχέτιση αυτή μπορεί να συμβάλλει στην χρησιμοποίηση πιθανών διαγνωστικών δεικτών για την παρακολούθηση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου.

Το γονίδιο APC θεωρείται ένα γονίδιο καταστολής όγκου του καρκίνου του παχέος εντέρου και απορρυθμίζεται τόσο στα βλαστικά όσο και στα σωματικά κύτταρα. Οι μεταβολές στο γονίδιο APC είναι ένα πρόωρο, αν όχι αναρκτήριο, γεγονός για το 80% -85% των σποραδικών ΚΠΕ<sup>302</sup>.

Η εξειδικευμένη ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων στα αδενώματα του ανθρώπινου εντέρου και του παρακείμενου βλεννογόνου, αποκαλύπτει ότι οι μεταλλάξεις APC είναι παρούσες σε προ-κακοήθεις βλάβες, υποστηρίζοντας το ρόλο του γονιδίου στην πρώιμη ανάπτυξη του αδενώματος του παχέος εντέρου και τη δυνατότητα στόχευσης και απώλειας του γονιδίου APC ως στρατηγική χημειοπροφύλαξης έναντι του καρκίνου.

Γενετικές μελέτες που χρησιμοποιούν μια ευρεία ποικιλία μοντέλων μεταλλαγμένων γονιδίων APC από ποντικούς απέδειξαν ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο APC είναι υπεύθυνες για την εντερική ογκογένεση. Αν και τα δύο αλληλόμορφα μεταβάλλονται σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου κυρίως με μεταλλάξεις ή με απώλεια ετεροζυγωτίας, οι μεταλλάξεις APC δεν προκαλούν γενικά πλήρη απώλεια της πρωτεΐνης APC. Αντίθετα, περισσότερο από το 90% των μεταλλάξεων του γονιδίου APC δημιουργούν πρόωρα

κωδικόνια τερματισμού. Σταθερή έκφραση κολοβωμένων πρωτεϊνών APC έχει ανιχνευθεί σε δείγματα ασθενών με ΟΑΠ και ΚΠΕ<sup>303</sup>.

Η απενεργοποίηση του γονιδίου APC έχει επίσης προταθεί για την προώθηση της ογκογένεσης μέσω της απώλειας προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου. Το APC αλληλεπιδρά με μια υποκυτταρική δεξαμενή β-κατενίνης η οποία χρησιμεύει ως συστατικό των προσκολλητικών συνδέσεων.

Η αντιφατική συμπεριφορά του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, που ευνοεί είτε τον πολλαπλασιασμό είτε την απόπτωση ενός κυττάρου, επιδεικνύεται σε διάφορων ειδών καρκινώματα, καθώς και σε πειραματικά μοντέλα<sup>304</sup>. Γνωρίζοντας ότι ο E2F1 έχει προταθεί ως ένας δυνητικός θεραπευτικός στόχος, ο προσδιορισμός της δράσης του στους διάφορους καρκινικούς τύπους αποτελεί σημαντική τομή στην έρευνα της επιστημονικής κοινότητας. Η απουσία αναφορών σχετικά με τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζει σε συνδυασμό με την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 σε κακοήγη καρκινώματα, καθώς και πιθανή βιολογική διάκριση στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκινωμάτων, καθιστά μια τέτοια μελέτη απαραίτητη<sup>305</sup>.

Η έκφραση του E2F1 και η σχέση του με την κινητική του όγκου σε ένα περιβάλλον δειγμάτων καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου είναι αντικείμενο μελέτης συγκεκριμένης επιστημονικής ομάδας. Καταγράφοντας και αναλύοντας τις περιπτώσεις σύμφωνα με την κατάσταση έκφρασης του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα, παρατηρήθηκε με ενδιαφέρον ότι η έκφραση του E2F1 συσχετίστηκε με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων<sup>306</sup>.

Η αυξημένη έκφραση του E2F1 πιθανολογείται να έχει εξαρτώμενη σχέση με την απόκριση του γονιδίου p53 στην ανάπτυξη του όγκου. Παρ' όλα αυτά, η βιβλιογραφική καταγραφή έκφρασης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα έχει αποδείξει ότι ο τρόπος δράσης του E2F1 σε διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων μπορεί να είναι ανεξάρτητος από την έκφραση της πρωτεΐνης p53<sup>307,308</sup>.

Η ικανότητα του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 να προκαλέσει, την εξαρτώμενη από την p53, απόπτωση έχει αποδοθεί κυρίως στην ογκογονική πρωτεΐνη P14ARF, που αποτελεί στόχο του E2F1<sup>309</sup>. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα συγκεκριμένης έρευνας, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης

P14ARF μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για ασθενείς με ΚΠΕ. Έχει αποδειχθεί μέσω ανάλυσης έκφρασης με ποσοτική RT-PCR ότι τα γονίδια mdm2, P14ARF, P16INK4A και c-myc εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε εξάρσεις που οδηγούν σε καρκινικά κύτταρα Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας (ΟΜΛ). Τρία από αυτά τα γονίδια είναι στενά συνδεδεμένα μέσω μίας συγκεκριμένης κυτταρικής οδού: η πρωτεΐνη c-myc οδηγεί σε επαγωγή της P14ARF, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την αλληλεπίδραση και τη δραστηριότητα του συμπλόκου mdm2-p53. Το γονίδιο c-myc αλλά και το γονίδιο mdm2 είναι ογκογόνα, και η υπερέκφραση του mdm2 αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό αδρανοποίησης της p53. Μεταλλάξεις του καταστολέα όγκου p53 είναι σχετικά σπάνιες στα καρκινικά κύτταρα ΟΜΛ. Έτσι, η δραστηριότητα της p53 μπορεί να αδρανοποιηθεί στην ΟΜΛ από την υπερέκφραση του mdm2. Η έκφραση του γονιδίου P14ARF που αποτελεί καταστολέα όγκου, βρίσκεται επίσης αυξημένη σε πολλά δείγματα ασθενών με ΟΜΛ. Η υψηλή έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στην ΟΜΛ πιθανολογείται να είναι εν μέρει αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του γονιδίου c-myc.

Η χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης P14ARF έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με κακή πρόγνωση των ασθενών. Αυτό το αποτέλεσμα είναι ακόμα περισσότερο εντυπωσιακό όταν οι ασθενείς των δύο ομάδων μελέτης αντιμετωπίζονται με διαφορετικά σχήματα χημειοθεραπείας και τα αρχικά παρασκευάσματα των δειγμάτων πραγματοποιούνται σε διαφορετικά εργαστήρια. Αυτή η ανεξάρτητη επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων τονίζει τη σημασία των ευρημάτων κάθε φορά και μπορεί να δείξει ότι η P14ARF πιθανότατα αποτελεί έναν κατάλληλο προγνωστικό δείκτη για κλινική χρήση.

Ενώ η μελέτη μας καθόρισε τον προγνωστικό ρόλο της πρωτεΐνης P14ARF στον ΚΠΕ, η ικανότητα πρόγνωσης μέσω της πρωτεΐνης P14ARF για το συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων είναι ασαφής. Στη σειρά των καρκινικών ιστών που μελετήθηκαν, οι ατελείς πληροφορίες παρακολούθησης των συγκεκριμένων κυττάρων δε συμπεριλαμβάνουν συμπεράσματα σχετικά με την επιβίωσή τους. Γνωρίζοντας ότι η πρωτεΐνη P14ARF ρυθμίζει την p53, η συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων P14ARF με πιθανή μειωμένη επιβίωση των κυττάρων δε θα αποτελούσε έκπληξη. Η απώλεια του ARF είναι γνωστό ότι προκαλεί αντίσταση σε συγκεκριμένες

χημειοθεραπείες και αναστέλλει τη σχετιζόμενη με ακτινοβολία απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.

Οι ασθενείς που αναλύθηκαν σε τέτοιου είδους μελέτες υποβλήθηκαν σε εντατικές χημειοθεραπείες μετά τη διάγνωση τους με συγκεκριμένους τύπους καρκίνων. Σε αυτούς τους ασθενείς, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου P14ARF δεν συσχετίστηκαν με την επαγωγή πλήρους ύφεσης της νόσου. Ωστόσο, οι επακόλουθες υποτροπές ήταν πολύ συχνότερες σε δείγματα ασθενών με χαμηλή έκφραση του P14ARF. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η χαμηλή έκφραση του P14ARF σχετίζεται με υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής σε συγκεκριμένες χημειοθεραπείες.

Σε συνδυασμό με τα τρέχοντα αποτελέσματά μας, τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τη δυνατότητα συγκεκριμένης κυτταρικής οδού να έχει σημαντικό ρόλο στη γένεση των κυττάρων του ΚΠΕ. Κατά συνέπεια, η ανάλυση των επιπέδων P14ARF μπορεί να είναι ιδιαίτερα πολύτιμη σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, δεδομένου ότι η πρόγνωση για αυτήν την ομάδα ασθενών είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθεί.

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης Ki67 έχει αποτελέσει σημαντική τομή στην ιστοπαθολογία του καρκίνου και συμβάλλει μέχρι σήμερα στην αξιολόγηση της ανάπτυξης του όγκου σε ασθενείς με καρκίνο. Αν και η Ki-67 αντιπροσωπεύει έναν πολύτιμο δείκτη και εργαλείο σε κλινικό επίπεδο, ο λειτουργικός της ρόλος παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Έρευνες που έχουν συμβάλλει στη διερεύνηση των κυτταρικών λειτουργιών της Ki-67 δείχνουν ότι η παρουσία της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στην πραγματικότητα, ερευνητικά πειράματα που χρησιμοποίησαν συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια του mRNA της Ki-67 είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του DNA<sup>310</sup>.

Επιπλέον, η μικροέγχυση αντισωμάτων κατά της Ki-67 σε μοντέλα ποντικών έχει προκαλέσει σημαντική μείωση του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων. Ένας πιθανός ρόλος της Ki-67 που έχει προταθεί είναι στα πρώιμα στάδια της σύνθεσης του rRNA και στη βιογένεση ριβοσωμάτων λόγω απόκρισης σημάτων της μίτωσης. Ωστόσο, λόγω της ελλιπούς φύσης των τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα της Ki-67, πιθανές επιδράσεις σε άλλα γονίδια μπορεί να έχουν οδηγήσει σε ανακριβή συμπεράσματα όσον αφορά τη συμμετοχή της Ki-67 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Επιπλέον, οι μελέτες αυτές δεν έχουν χρησιμοποιήσει τεχνικές γονιδιακής εξουδετέρωσης και επομένως δεν είναι σαφείς οι συνέπειες της απώλειας του συγκεκριμένου γονιδίου που κωδικοποιεί την Ki-67 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων<sup>311</sup>.

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ki67 δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρα αυξημένα ή μειωμένα, στη ζωή ενός κυττάρου. Η πρωτεΐνη Ki67 υποβαθμίζεται συνεχώς κατά τη διάρκεια των φάσεων G0 και G1 και παράγεται συνεχώς από την αρχή της φάσης S μέχρι την έξοδο της μιτωτικής φάσης. Επομένως, τα επίπεδα πρωτεΐνης Ki67 σε έναν κυτταρικό πληθυσμό εκτείνονται σε ένα μεγάλο φάσμα. Σε αυτό το φάσμα, η έκφραση της Ki67 σε ένα ξεχωριστό κύτταρο είναι μια συνάρτηση της τρέχουσας φάσης στον κυτταρικό κύκλο, καθώς και του ιστορικού του.

Δηλαδή, όσο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ένα κύτταρο έχει προηγουμένως περάσει σε ηρεμία, τόσο χαμηλότερα θα είναι τα επίπεδα της Ki67 κατά την επαναφορά του στον κυτταρικό κύκλο. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ένα απλό συμπέρασμα έκφρασης ή μη έκφρασης της Ki67 ως θετικού ή αρνητικού προγνωστικού δείκτη σε έναν πληθυσμό καρκινικών κυττάρων μπορεί να είναι λανθασμένη ή ελλιπή<sup>312</sup>.

Η ανάλυση ζωντανών κυττάρων αποκαλύπτει ότι τα επίπεδα Ki67 σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα είναι σε ένα τοπικό ελάχιστο στην μετάβαση G1 / S, ενώ τα επίπεδα Ki67 σε κύτταρα που μεταφέρονται αργά στον κυτταρικό κύκλο και περνάνε πολύ χρόνο σε ηρεμία πριν επανέλθουν σε αυτόν, είναι μη ανιχνεύσιμα στη μετάβαση G1 / S. Από κλινική άποψη, αυτό σημαίνει ότι μπορούν να ληφθούν πρόσθετες πληροφορίες μέσα από ανάλυση ανοσοϊστοχημείας για τα επίπεδα της Ki67 πέρα από το ποσοστό των Ki67-θετικών κυττάρων σε μία βιοψία. Με την ποσοτικοποίηση των επιπέδων Ki67 σε μια βιοψία ιστού σε μιτωτικά κύτταρα (για να ληφθεί μια τιμή για την αρχική κατάσταση), αλλά και σε κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της φάσης G1 και πρώιμης φάσης S (χαρακτηριζόμενα, για παράδειγμα, από υψηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Rb ή χαμηλά, αλλά όχι μηδενικά, επίπεδα κυκλίνης A), μπορεί να παρθούν συμπεράσματα για το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τον τελευταίο κυτταρικό διαχωρισμό<sup>313</sup>.

Σε επίπεδο πληθυσμού εντός ενός όγκου, η κατανομή των επιπέδων του Ki67 αποτελεί ένδειξη για το πόσο γρήγορα αναπτύσσεται ο όγκος. Έτσι, οι

ταχέως αναπτυσσόμενοι όγκοι θα έχουν μία ευρεία κατανομή των επιπέδων του Ki67, εντός των καρκινικών κυττάρων με αυξημένη συγκέντρωση στα κύτταρα που βρίσκονται στη μιτωτική φάση. Ωστόσο, οι βραδέως αναπτυσσόμενοι όγκοι θα έχουν κατανομή των επιπέδων της Ki67 με αυξημένη συγκέντρωση σε κύτταρα που βρίσκονται σε γειτονικούς μη καρκινικούς ιστούς, με αποτέλεσμα τέτοιου είδους όγκοι να αναπτύσσονται σε ενδιάμεσες τιμές έκφρασης της πρωτεΐνης.

Σε μια πρόσφατη μελέτη ερευνήθηκε η δυνατότητα εάν το Ki-67 μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανός δείκτης όγκου στην κτηνιατρική. Μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του Ki-67 στον ορό σε σκύλους με διάφορους κακοήθεις όγκους. Οι σκύλοι με κακοήθεις όγκους εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις Ki-67 στον ορό σε σύγκριση με υγιείς σκύλους και μη νεοπλασματικά άρρωστα σκυλιά. Δεν ανιχνεύθηκε σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του Ki-67 στον ορό μεταξύ του καρκινώματος, του σαρκώματος και του λεμφώματος, ούτε μεταξύ του αδενοκαρκινώματος του μαστού και του αδενώματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι το Ki-67 μπορεί να είναι χρήσιμο ως πιθανός δείκτης όγκου, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με την παρουσία κακοηθειών σε έναν οργανισμό.

Η ταξινόμηση των όγκων σε αυτές τις κατηγορίες, αφού έχει γίνει επικύρωση αποτελεσμάτων με επιπρόσθετες μεθόδους, θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο πρόγνωσης και επιλογής των κατάλληλων θεραπειών του ασθενούς και να παραδώσει μία επιπλέον ανάγνωση των αποκρίσεων εντός ενός όγκου σε συνεχόμενες θεραπείες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά, η ερευνητική κοινότητα βρίσκεται επί του παρόντος σε μια κρίσιμη καμπή σχετικά με το πώς είναι δυνατό να σχεδιαστούν προσαρμοσμένες στρατηγικές θεραπείας, λαμβάνοντας υπόψη τη λειτουργική συμβολή γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στη ρύθμιση των μηχανισμών που σηματοδοτούν έναρξη νεοπλασματικής νόσου. Υπό αυτή την έννοια, η μοριακή υπογραφή κάθε καρκίνου θα ήταν η περιγραφή ενός συγκεκριμένου συνόλου αλλαγών, με τις οποίες ένας συγκεκριμένος όγκος ξεφεύγει από αυτούς τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Με βάση αυτή τη γνώση, είναι δυνατό να επιλεγούν κατάλληλοι συνδυασμοί θεραπευτικών παραγόντων για την αναστροφή ή τον αποκλεισμό των λειτουργικών συνεπειών αυτών των βλαβών του όγκου.

Στοχεύοντας συγκεκριμένα και ταυτόχρονα πολλαπλά μονοπάτια που βασίζονται σε μοριακές υπογραφές, τέτοιες προσεγγίσεις μπορούν να προσφέρουν μεγαλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Ταυτόχρονα έχουν λιγότερες παρενέργειες από τις συμβατικές κυτταροτοξικές θεραπείες. Ένα από τα απαραίτητα βήματα στη θεραπεία του καρκίνου είναι η ανάπτυξη μοριακών δεικτών που βοηθούν στην πρόβλεψη της επιβίωσης, της πιθανής συμπεριφοράς και της επιθετικότητας του όγκου.

Από στατιστικής απόψεως, οι πολλαπλές συγκρίσεις που γίνονται για να αναλυθούν πιθανές συνάφειες μεταξύ των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου που συνδέονται με την επιβίωση του κυττάρου, ενισχύουν την πιθανότητα ότι οι διαφορές που εμφανίζονται στα διαφορετικά αποτελέσματα και μετρήσεις είναι τυχαίες. Επομένως, είναι πολύ σημαντική πάντοτε η επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Ως εκ τούτου, μία ανάλυση από μια δεύτερη ομάδα δειγμάτων ασθενών μπορεί να συγκροτήσει τα αποτελέσματα με μεγαλύτερη εγκυρότητα και να τα καθιερώσει ως στατιστικώς σημαντικά.

Με τον τρόπο αυτό είναι πιθανή η χρήση των γονιδίων της παρούσας διπλωματικής εργασίας για έγκαιρη διάγνωση ΚΠΕ και στοχευμένη αντιμετώπισή του. Ήδη στο Πανεπιστήμιο Johns Hopkins, ανιχνεύονται σε

εξετάσεις αίματος, τα γονίδια NMT1, APC, και TP53. Οι εξετάσεις αυτές πραγματοποιούνται προκειμένου να εξακριβώσουν την ύπαρξη ΚΠΕ ή δυνητικά άλλων τύπων καρκίνου, σε ασθενείς. Με τον τρόπο αυτό αυξάνουν την ακρίβεια στην πρώτη ένδειξη εισαγωγής τους σύμφωνα με τον επικεφαλή ερευνητή του προγράμματος. Με τον ίδιο τρόπο και γνωρίζοντας τη σχέση μεταξύ των γονιδίων APC, E2F1 και P14ARF, μπορεί μέσω μιας απλής αιμοληψίας να εντοπιστεί ο ΚΠΕ και να σχεδιαστεί ένα στοχευμένο εξατομικευμένο θεραπευτικό πλάνο.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. BG, T., V.T. H, and Z. FA., Adjuvant 5FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stages II and III. . Br J Cancer, 2001. 10(85): p. 1437–1443.
2. American Joint Committee on Cancer. Cancer staging manual. . 2003(5th ed.): p. 83–90.
3. Torre LA, B.F., Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A Global cancer statistics 2018. CA Cancer J Clin, 2015(65): p. 87-108.
4. P, J., et al., Elective surgery for colorectal cancer in a defined Swedish population. Eur J Surg Oncol, 2004. 30(1): p. 26-33.
5. J, M., et al., Colorectal Cancer Working Group, Royal College of Surgeons of England Clinical Epidemiology and Audit Unit. Population-based audit of colorectal cancer management in two UK health regions. British Journal of Surgeons, 1997. 84(12): p. 1731-1736.
6. LE, K., Carcinoma of the colon in Finland. A nation-wide clinical study of cases from 1975. Acta Chir Scand, 1987. 153(2): p. 123-131.
7. RJ, H. and M. BJ, Embryology and anatomy of the rectum Semin Surg Oncol 1998(15): p. 66-71.
8. Christos, M. [http://www.smyrlis-laparoscopic.gr/com/59\\_Karkinos-paxeos---orthoy](http://www.smyrlis-laparoscopic.gr/com/59_Karkinos-paxeos---orthoy) [cited 2015 11/07].
9. Arthur C. Guyton, J.E.H., Φυσιολογία του ανθρώπου και μηχανισμοί των νόσων. Vol. 6. 2001, Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου.
10. JA, B., Chronic ulcerative colitis associated with malignant disease. Arch Surg, 1928. 17: p. 561-565.
11. Eaden JA, A.K., Mayberry JF, The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. Gut, 2001. 48: p. 526-535.
12. von Roon AC, R.G., Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP, The risk of cancer in patients with Crohn's disease. Dis Colon Rectum, 2007. 50: p. 839-855.
13. Ekbohm A, H.C., Zack M, Adami HO., Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. . N Engl J Med, 1990. 323: p. 1228-1233.

14. P., M., Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. 18: p. 1-5.
15. Crohn UB, R.H., The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci*, 1925. 170: p. 220-228.
16. Beaugerie L, S.M., Seksik P, Bouvier AM, Simon T, Allez M, et al, Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2013. 145: p. 175-178.
17. Viennot S., D.A., Moussata D., Nancey S., Flourie B., Colon cancer in inflammatory bowel disease: recent trends, questions and answers. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 2009. 33(3): p. 190-201.
18. Gearhart SL., N.H., Pawlik TM, Wick E, Efron J, Shore AD., A surveillance Epidemiology and End Results Medicare study. . *Dis Colon Rectum*, 2012. 55: p. 270-277.
19. Ogino S, K.E., Beck AH, Sherman ME, Milner DA, Giovannucci E., Interdisciplinary education to integrate pathology and epidemiology: towards molecular and population-level health science. *Am J Epidemiol*, 2012. 176: p. 659-67.
20. Ogino S, L.P., Chan AT, Nishihara R, Cho E, Wolpin BM, et al., Molecular pathological epidemiology of epigenetics: emerging integrative science to analyze environment, host and disease. *Mod Pathol*, 2013. 26: p. 465-484.
21. Bernstein CN, B.J., Kliewer E, Wajda A., Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 2001. 91: p. 854-862.
22. Jess T, L.E.J., Velayos FS, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Smyrk TC, et al., Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota. *Gastroenterology*, 2006. 130: p. 1039-1046.
23. Winther KV, J.T., Langholz E, Munkholm P, Binder V., Longterm risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004. 2: p. 1088-1095.

24. Lutgens MW, v.d.H.G., Vleggaar FP, Oldenburg B., A comprehensive meta-analysis of the risk of colorectal carcinoma in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 2008. 57(2): p. A131.
25. Rutter MD, S.B., Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, et al., Thirty years analysis of colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2006. 130: p. 1030-1038.
26. Ekobom A, H.C., Zack M, Adami HO., Increased risk of large bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990. 336: p. 357-9.
27. Canavan C, A.K., Mayberry J. , Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. 23: p. 1097-104.
28. Jess T, G.M., Matzen P, Munkholm P, Sorensen TI., Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol*, 2005. 100: p. 2724-9.
29. JF., F., Lésions précancéreuses et MICI : aspects anatomopathologiques. *Gastroenterol Clin Biol*, 2004. 28: p. 140-8.
30. Lodewijk A.A. Brosens, G.J.A.O., Francis M. Giardiello, Hereditary Colorectal Cancer : Genetics and Screening. *Surgical Clinics of North America*, 2015: p. In Press.
31. Lichtenstein P, H.N., Verkasalo PK, et al. , Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 2000. 343: p. 78-85.
32. WM., G., Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*, 2003. 124: p. 1574-1594.
33. Kory W. Jasperson, T.M.T., Deborah W. Neklason, Randall W. Burt, Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 2010. 138: p. 2044-2058.
34. Lynch HT, d.I.C.A., Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2003. 348: p. 919-935.
35. Hampel H, F.W., Martin E, et al, Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2008. 26: p. 5783-5788.

36. Stoffel E, M.B., Raymond VM, et al, Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology*, 2009. 137: p. 1621-1627.
37. Ribic CM, S.D., Moore MJ, et al., Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*, 2003. 349: p. 247-257.
38. Burt RW, L.M., Slattery ML, et al., Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 2004. 127: p. 444-451.
39. Hes FJ, N.M., Bik EC, et al, Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut*, 2008. 57: p. 71-76.
40. Nieuwenhuis MH, V.H., Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007. 61: p. 153-161.
41. Tranah GJ, G.E., Ma J, Fuchs C, Hunter DJ, APC Asp1822Val and Gly2502Ser polymorphisms and risk of colorectal cancer and adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. 14: p. 863-870.
42. Tulupova E, K.R., Hanova M, et al. , Do polymorphisms and haplotypes of mismatch repair genes modulate risk of sporadic colorectal cancer? *Mutat Res* 2008. 648: p. 40-45.
43. Zauber NP, S.-S.M., Marotta SP, Bishop DT, The characterization of somatic APC mutations in colonic adenomas and carcinomas in Ashkenazi Jews with the APC I1307K variant using linkage disequilibrium. *J Pathol*, 2003. 199: p. 146-151.
44. Jeremy P. Cheadle, J.R.S., Exposing the MYth about base excision repair and human inherited disease. *Human Molecular Genetics*, 2003. 12(2): p. 159-165.
45. Maricarmen Cristofaro, A.C., Simona D'Amore, Nicola Martelli, Ada Fiorenza Spaziante, Antonio Moschetta, Gaetano Villani, Adenomatous polyposis coli (APC)-induced apoptosis of HT29 colorectal cancer cells depends on mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2015. 1852(9): p. 1719-1728.



46. Cleary SP, et al., Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology*, 2009. 136: p. 1251-1260.
47. Yan Zhang, G.L., Qingtao Hu, Xueyan Wang, Chaohua Li, Yuegan Mao, Manhua Cui, A de novo germline mutation of APC for inheritable colon cancer in a Chinese family using multigene next generation sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014. 447(3): p. 503-507.
48. Joo-Hyun Kim, Y.H.K., Gyu-Yong Song, Dong-Eun Kim, Yong-Joo Jeong, Kwang-Hyeon Liu, Young-Hwa Chung, Sangtaek Oh, Ursolic acid and its natural derivative corosolic acid suppress the proliferation of APC-mutated colon cancer cells through promotion of  $\beta$ -catenin degradation. *Food and Chemical Toxicology*, 2014. 67: p. 87-95.
49. Alexander J. Byun, K.E.H., James C. Fleet, Roderick T. Bronson, Joel B. Mason, Paloma E. Garcia, Jimmy W. Crott, Colon-specific tumorigenesis in mice driven by Cre-mediated inactivation of Apc and activation of mutant Kras. *Cancer Letters*, 2014. 347(2): p. 191-195.
50. Won-Suk Lee, G.S., Hee Jung Shin, Seong Hyeon Yun, Haeran Yun, Naeyun Choi, Jinseon Lee, Daesoon Son, Jisook Cho, Jhingook Kim, Yong Beom Cho, Ho-Kyung Chun, Woo Yong Lee, Identification of Differentially Expressed Genes in Microsatellite Stable HNPCC and Sporadic Colon Cancer. *Journal of Surgical Research*, 2008. 144(1): p. 29-35.
51. Zhaojing Wang, Y.X., Xiangning Meng, Fumio Watari, Hudan Liu, Xiao Chen, Suppression of c-Myc is involved in multi-walled carbon nanotubes' down-regulation of ATP-binding cassette transporters in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015. 282(1): p. 42-51.
52. Cheng Chen, S.C., Guihua Wang, Xiaonian Cao, Xi Yang, Xuelai Luo, Yongdong Feng, Junbo Hu, c-Myc enhances colon cancer cell-mediated angiogenesis through the regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013. 430(2): p. 505-511.

53. Jiezhong Chen, A.E., Mei Han, Chen Chen, M. Wasif Saif, The Role of Src in Colon Cancer and Its Therapeutic Implications. *Clinical Colorectal Cancer*, 2014. 13(1): p. 5-13.
54. Eun-Jung Park, H.-J.C., Hyen Joo Park, Gi Dae Kim, Yong-Hyun Ahn, Sang Kook Lee, Suppression of Src/ERK and GSK-3/ $\beta$ -catenin signaling by pinosylvic acid inhibits the growth of human colorectal cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. 55: p. 424-433.
55. Jr, R.R., Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 2015. 94: p. 9-25.
56. Sujin Choi, Y.C., Nguyen Tien Dat, Cheol Hwangbo, Jung Joon Lee, Jeong-Hyung Lee, Tephrasin induces internalization and degradation of EGFR and ErbB2 in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 2010. 293(1): p. 23-30.
57. Woo K. Kim, M.H.B., Eul S. Kim, Nam E. Kang, Kyeong C. Jung, Han J. Cho, Jung H.Y. Park, Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005. 16(3): p. 155-162.
58. Lynch, P.M., The hMSH2 and hMLH1 Genes in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 2009. 18(4): p. 611-624.
59. R.H. Martin, J.G., E. Ko, L. Barclay, A.W. Rademaker, Analysis of Aneuploidy Frequencies in Sperm from Patients with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer and an hMSH2 Mutation. *The American Journal of Human Genetics*, 2000. 66(3): p. 1149-1152.
60. Christopher D. Heinen, T.W., Anthony Mazurek, Mark Berardini, Charles Butz, Richard Fishel, HNPCC mutations in hMSH2 result in reduced hMSH2-hMSH6 molecular switch functions. *Cancer Cell*, 2002. 1(5): p. 469-478.
61. Allison E. Anderson, K.A.H., N. Jewel Samadder, Ray M. Merrill, and Anita Y. Klinney, Rural vs Urban Residence Affects Risk-Appropriate Colorectal Cancer Screening. *CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, 2013. 11: p. 526-533.

62. Coughlin SS, T.T., Colorectal cancer screening practices among men and women in rural and nonrural areas of the United States 1999. *J Rural Health*, 2004. 20: p. 118-184.
63. Bennett KJ, P.J., Bellinger JD., Receipt of cancer screening services: surprising results for some rural minorities. *J Rural Health*, 2012. 28: p. 63-72.
64. Sudheer K. Mantena, S.K.K., Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006. 40: p. 1603-1614.
65. Wilhelm, S.M.C., C.; Tang, L.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; Cao, Y.; Shujath, J.; Gawlak, S.; Eveleigh, D.; Rowley, B.; Liu, L.; Adnane, L.; Lynch, M.; Auclair, D.; Taylor, I.; Gedrich, R.; Voznesensky, A.; Riedl, B.; Post, L. E.; Bollag, G.; Trail, P. A., BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.*, 2004. 64: p. 7099-7109.
66. Dunn, C.W., C.; MacLaren, A.; Gillespie, D. A., Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signaling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signalling*, 2002. 4: p. 585-593.
67. J. Engstrand, H.N., A. Jansson, B. Isaksson, J. Freedman, L. Lundell, E. Jonas, A multiple microwave ablation strategy in patients with initially unresectable colorectal cancer liver metastases e A safety and feasibility study of a new concep. *EJSO*, 2014. 40: p. 1488-1493.
68. T. de Baere, F.D., New tumor ablation techniques for cancer treatment (microwave, electroporation). *Diagnostic and Interventional Imaging*, 2014. 95: p. 677-682.
69. Martin RC, S.C., McMasters KM, Safety and efficacy of microwave ablation of hepatic tumors: a prospective review of a 5-year experience. *Ann Surg Oncol*, 2010. 17: p. 171-178.
70. Liang P, W.Y., Yu X, Dong B. , Malignantliver tumors:treatment with percutaneous microwave ablation — complications among cohort of 1136 patients. *Radiology*, 2009. 251: p. 933-940.

71. Ιακωβάκης, Δ.Β., ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΑ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ. ΕΜΠ, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών. Διπλωματική εργασία, 2008.
72. Gamble, J., Risk of gastrointestinal cancers from inhalation and ingestion of asbestos. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2007. 52: p. 124-153.
73. Selikoff, I.J., Hammond, E.C., Seidman, H., Mortality experience of insulation workers in the United States and Canada, 1943–1976. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1979. 330: p. 91-116.
74. Selikoff, I.J., Seidman, H., Hammond, E.C, Mortality: effects of cigarette smoking among amosite asbestos factory workers. *JNC*, 1980. 65: p. 507-513.
75. Severson, R.A., A Study of the Effects of Asbestos in Drinking Water and Cancer Incidence in the Puget Sound Region. M.S. Thesis. University of Washington, Seattle, Washington, 1979.
76. Sigurdson, E.E., Levy, B.S., Mandel, J., McHugh, R., Michienzi, L.J., Jagger, H., Pearson, J., Cancer morbidity investigations: lessons from the Duluth study of possible effects of asbestos in drinking water. *Environ. Res.*, 1981. 25: p. 50-61.
77. Carolina Mensi, L.R., Sara De Matteis, Pier Alberto Bertazzi, Dario Consonni, Impact of an asbestos cement factory on mesothelioma incidence: Global assessment of effects of occupational, familial, and environmental exposure. *Environment International*, 2015. 74: p. 191-199.
78. Fiege H, V.H.-W., Hamamoto T, Umemura S, = Iwata T, Miki H, Fujita Y, Buysch H-J, = Garbe D, Paulus W, Phenol Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
79. Chen ZJ, Y.X., Liu H, Wei W, Zhang KS, Huang HB, Giesy JP, Liu HL, Du J, Wang HS., Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions. *Arch Toxicol.* , 2015. 89(9): p. 1371-1381.

80. Ribeiro-Varandas E, R.F., Viegas W, Delgado M, Cytotoxicity of *Eupatorium cannabinum* L. ethanolic extract against colon cancer cells and interactions with Bisphenol A and Doxorubicin. *BMC Complement Altern Med*, 2014. 24(14): p. 264.
81. Bolli A, B.P., Galluzzo P, Acconcia F, Marino M., Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life*, 2010. 62(9): p. 684-687.
82. Laura N. Vandenberg, R.H., Michele Marcus, Nicolas Olea, Wade V. Welshons, Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 2007. 24: p. 139-177.
83. Inoue K, M.S., Takeba K, Yoshimura Y, Nakazawa H., Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey. *J Food Compos Anal*, 2003. 16: p. 497-506.
84. A. Rogel, K.J., C. Metz-Flamant, O. Laurent, M. Tirmarche, D. Hubert, Y. Garcier, D. Laurier, Mortality in nuclear workers of the French electricity company: Period 1968–2003. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 2009. 57(4): p. 25-33.
85. E., R., The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): plans and progress. *Journal of Nutrition*, 2001. 131: p. 170–175.
86. Alasalvar, C., Shahidi, F., Ohshima, T., Wanasundara, U., Yurttas, H. C., Liyanapathirana, C. M., et al., Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid characteristics and oxidative stability. *Agricultural and Food Chemistry*, 2003b. 51(13): p. 3797-3805.
87. Alasalvar, C., Shahidi, F., & Cadwallader, K. R., Comparison of natural and roasted Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) volatiles and flavor by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003a. 51(17): p. 5067-5072.
88. Chunhao Yu, X.-D.W., Zhiyu Zhang, Chun-Feng Zhang, Xiaohui Wu, Xin He, Yang Liao, Ningning Wu, Chong-Zhi Wang, Wei Du, Tong-Chuan He, Chun-Su Yuan, American ginseng significantly reduced the progression of high-fat-diet-enhanced colon carcinogenesis in *ApcMin/p* mice. *Journal of Ginseng Research*, 2015. 39: p. 230-237.

89. Del Rio, D., Calani, L., Dall'Asta, M., & Brighenti, F, Polyphenolic composition of hazelnut skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. 59(18): p. 9935-9941.
90. Park HJ, Y.S., Han LS, Zheng LT, Jung KH, Uhm YK, Lee JH, Jeong JS, Joo WS, Yim SV, Chung JH, Hong SP., Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol.*, 2005. 11(33): p. 5156-5161.
91. Bladé, C., Arola, L., & Salvadó, M.-J., Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010. 54(1): p. 37-59.
92. Quinones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A., Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 2013. 68(1): p. 125-131.
93. Yucesan, F.B., Orem, A., Kural, B. V., Orem, C., & Turan, I., Hazelnut consumption decreases the susceptibility of LDL to oxidation, plasma oxidized LDL level and increases the ratio of large/small LDL in normolipidemic healthy subjects. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi: AKD = the Anatolian Journal of Cardiology*, 2010. 10(1): p. 28-35.
94. Tey, S.L., Brown, R. C., Chisholm, A. W., Delahunty, C. M., Gray, A. R., & Williams, S. M., Effects of different forms of hazelnuts on blood lipids and atocopherol concentrations in mildly hypercholesterolemic individuals. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2011. 65(1): p. 117-124.
95. Orem, A., Yucesan, F. B., Orem, C., Akcan, B., Kural, B. V., Alasalvar, C., et al., Hazelnut-enriched diet improves cardiovascular risk biomarkers beyond a lipid-lowering effect in hypercholesterolemic subjects. *Journal of Clinical Lipidology*, 2013. 7(2): p. 123-131.
96. Casas-Agustench, P., Lopez-Uriarte, P., Bullo, M., Ros, E., Cabre-Vila, J. J., & Salas- Salvado, J., Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 2011. 21(2): p. 126-135.

97. A. Vejux, L.M., G. Lizard,, Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz. J. Med. Biol. Res*, 2008. 41: p. 545-556.
98. G. Leonarduzzi, P.G., S. Gargiulo, B. Sottero, A. Kadl, F. Biasi, E. Chiarpotto, N. Leitinger, G. Vendemiale, G. Serviddio, G. Poli,, Oxidation as a crucial reaction for cholesterol to induce tissue degeneration: CD36 over expression in human promonocytic cells treated with a biologically relevant oxysterol mixture. *Aging Cell*, 2008. 7: p. 375-382.
99. B. Sottero, P.G., S. Gargiulo, G. Leonarduzzi, G. Poli, Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.*, 2009. 16: p. 685-705.
100. Fiorella Biasi, E.C., Barbara Sottero, Marco Maina, Cinzia Mascia, Tina Guina, Paola Gamba, Simona Gargiulo, Gabriella Testa, Gabriella Leonarduzzi, Giuseppe Poli, Evidence of cell damage induced by major components of a diet-compatible mixture of oxysterols in human colon cancer CaCo-2 cell line. *Biochimie*, 2013. 95: p. 632-640.
101. J.F. Carvalho, M.M.S., J.N. Moreira, S. Simões, M.L. Sáo Melo,, Sterols as anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis,. *J. Med. Chem*, 2010. 53: p. 7632-7638.
102. A. Jusakul, P.Y., W. Loilome, N. Namwat, R. Kuver, Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis*, 2011. 10: p. 44.
103. G. Leonarduzzi, B.V., B. Sottero, V. Verde, P. Gamba, C. Mascia, E. Chiarpotto, G. Poli, F. Biasi,, Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol,. *Antioxid. Redox Signal*, 2006. 8: p. 375-380.
104. M.C. Alley, D.A.S., A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, M.R. Boyd, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 1988. 48: p. 589-601.
105. Antoni Caimari, F.P., Manuel Suarez, Anna Crescenti, Sirle Laos, Juan Antonio Ruiz, Virginia Alonso, Josep Moragas, Josep Maria del Bas, Lluís Arola, The intake of a hazelnut skin extract improves the plasma lipid profile and reduces the lithocholic/deoxycholic bile acid faecal ratio,

- a risk factor for colon cancer, in hamsters fed a high-fat diet. *Food Chemistry*, 2015. 167: p. 138-144.
106. Okazaki, Y., Utama, Z., Suidasari, S., Zhang, P., Yanaka, N., Tomotake, H., et al, Consumption of vitamin B(6) reduces fecal ratio of lithocholic acid to deoxycholic acid, a risk factor for colon cancer, in rats fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2012. 58(5): p. 366-370.
  107. Debruyne, P.R., Bruyneel, E. a., Li, X., Zimber, A., Gespach, C., & Mareel, M. M., The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutation Research*, 2001: p. 480-481.
  108. Sánchez, D., Moulay, L., Muguerza, B., Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A., Effect of a soluble cocoa fiber-enriched diet in Zucker fatty rats. *Journal of Medicinal Food*, 2010. 13(3): p. 621-628.
  109. M.H. Zaki, M.L., T.D. Kannegant, The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunology*, 2011. 32: p. 171-179.
  110. Y. Zhu, T.M.L., C. Jobin, H.A. Young,, Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett.* , 2011. 309: p. 119-127.
  111. Stani D. Day, R.T.E., Jamie L. McClellan, J.L. Steiner, Kandy T. Velázquez, E.A. Murphy, Linking inflammation to tumorigenesis in a mouse model of high-fat-diet-enhanced colon cancer. *Cytokine*, 2013. 64: p. 454-462.
  112. George Pounis, M.B., Kiera M. Tuohy, Maria Benedetta Donati, Giovanni de Gaetano, Licia Iacoviello, Population level divergence from the mediterranean diet and the risk of cancer and metabolic disease. *Diet-Microbe Interactions in the Gut*, 2015. *Effects on Human Health and Disease*(14): p. 209-223.
  113. Vincent A. van Beelen, B.S., Hans Mooibroek, Lolke Sijtsma, Dirk Bosch, Ivonne M.C.M. Rietjens, Gerrit M. Alink, An n-3 PUFA-rich microalgal oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2009. 47: p. 316-320.
  114. Hong, M.Y., Lupton, J.R., Morris, J.S., Wang, N., Carroll, R.J., Davidson, L.A., Elder, R.H., Chapkin, R.S., Dietary fish oil reduces O6-



- methylguanine DNA adduct levels in rat colon in part by increasing apoptosis during tumor initiation. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 2000. 9: p. 819-826.
115. Narayanan, B.A., Narayanan, N.K., Reddy, B.S, Docosaehaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 2001. 19: p. 1255-1262.
  116. Dommels, Y.E., Haring, M.M., Keestra, N.G., Alink, G.M., Van Bladeren, P.J., Van Ommen, B., The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE(2) synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, 2003a. 24: p. 385-392.
  117. Dommels, Y.E., Heemskerk, S., Van Den Berg, H., Alink, G.M., Van Bladeren, P.J., Van Ommen, B., Effects of high fat fish oil and high fat corn oil diets on initiation of AOM-induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. *Food Chem. Toxicol*, 2003b. 41: p. 1739-1747.
  118. Kontou, N., The Medietaranean Diet in cancer prevention. *The Mediterranean Diet 2015*. 36: p. 393-406.
  119. Manson JE, W.W., Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, et al., Body weight and mortality among women. *N Engl J Med*, 1995. 333: p. 677-685.
  120. Flegal KM, C.M., Ogden CL, Johnson CL., Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA*, 2002. 288: p. 1723-1727.
  121. National Institutes of Health, N.H.L.a.B.I., Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report. *Obes Res*, 1998. 2: p. 268-277.
  122. Feng-Yao Tang, M.-H.P., En-Pei Isabel Chiang, Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial–mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012. 23: p. 1302-1313.
  123. Meyerhardt JA, N.D., Hollis D, Saltz LB, Hu FB, Mayer RJ, et al., Association of dietary patterns with cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer. *JAMA*, 2007. 298: p. 754-64.

124. Larue L, B.A., Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 2005. 24: p. 7443-54.
125. Petroulakis E, M.Y., Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N., mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer*, 2006. 94: p. 195-9.
126. Castro-Carpeno J, B.-I.C., Casado SE, Hernandez AE, Feliu BJ, Gonzalez BM, EGFR and colon cancer: a clinical view. *Clin Transl Oncol*, 2008. 10: p. 6-13.
127. Morgensztern D, M.H., PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs*, 2005. 16: p. 797-803.
128. Johnson SM, G.P., Rampy BA, Han Y, Rychahou PG, Doan HQ, et al., Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J Am Coll Surg*, 2010. 210: p. 767-8.
129. Lu Z, C.-H.M., Windsor WT, Boyapati A., 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 regulates proliferation and survival of cancer cells with an activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cancer Res*, 2010. 8: p. 421-32.
130. Loboda A, N.M., Watters JW, Buser CA, Shaw PM, Huang PS, et al., EMT is the dominant program in human colon cancer. *BMC Med Genomics*, 2011. 4: p. 9.
131. IARC, weight control and physical activity IARC handbooks of cancer prevention. Lyon: Iarc Press, 2002. 6.
132. Lahmann PH, G.B., Olsson H, Boeing H, Berglund G, Lissner L., Birth weight is associated with postmenopausal breast cancer risk in Swedish women. *Br J Cancer*, 2004. 91: p. 1666-8.
133. Van den Brandt PA, S.D., Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, et al., Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*, 2000. 152: p. 514-27.
134. Enger SM, G.J., Polikoff J, Press M., Body weight correlates with mortality in early-stage breast cancer. *Arch Surg*, 2004. 139: p. 954-958.
135. Bergstrom A, P.P., Tenet V, Wolk A, Adami HO., Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*, 2001. 91: p. 421-430.

136. Calle EE, R.C., Walker-Thurmond K, Thun MJ, Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 2003. 348: p. 1625-38.
137. Vaughan TL, K.L., McKnight B., Colorectal cancer in patients with esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1995. 4: p. 93-97.
138. Chow WH, B.W., Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, et al., Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90: p. 150-155.
139. Tretli S, R.T., Height, weight and cancer of the oesophagus and stomach: a follow-up study in Norway. *Eur J Cancer Prev*, 1999. 8: p. 115-122.
140. Calle EE, K.R., Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 2004. 8: p. 579-591.
141. Terry P, G.E., Bergkvist L, Holmberg L, Wolk A., Body weight and colorectal cancer risk in a cohort of Swedish women: relation varies by age and cancer site. *Br J Cancer*, 2001. 85: p. 346-69.
142. Terry PD, M.A., Rohan TE., Obesity and colorectal cancer risk in women. *Gut*, 2002. 51: p. 191-194.
143. Pan SY, D.M., Morrison H, Wen SW, Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Obesity, high energy intake, lack of physical activity, and the risk of kidney cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. 15: p. 2453-60.
144. Chow WH, G.G., Fraumeni Jr JF, Jarvholm B., Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med*, 2000. 343: p. 1305-1311.
145. Rupnick MA, P.D., Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ., Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. 99: p. 10730-5.
146. P. Irigaray, J.A.N., S. Lacomme, D. Belpomme, Overweight/obesity and cancer genesis: More than a biological link. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2007. 61: p. 665-678.

147. P, B., Adipose tissue distribution and function. *Int J Obes*, 1991. 15: p. 67-81.
148. Irigaray P, M.L., Laurent F., Behaviour of dioxin in pig adipocytes. *Food Chem Toxicol*, 2005. 43: p. 457-460.
149. Williams, P.N., Villada, A., Deacon, C., Raab, A., Figuerola, J., Green, A.J., Feldmann, J., Meharg, A.A., Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environ. Sci. Technol*, 2007. 41: p. 6854-6859.
150. Raab, A., Baskaran, C., Feldmann, J., Meharg, A.A., Cooking rice in a high water to rice ratio reduces inorganic arsenic content. *J Environ. Monit.*, 2009. 11: p. 41-44.
151. Lammon, C.A., Hood, Ronald D., Effects of protein deficient diets on the developmental toxicity of inorganic arsenic in mice. *Birth Defects Res*, 2004. 71: p. 124-134.
152. Sun, G.X., Van de Wiele, T., Alava, P., Tack, F., Laing, G.D., Arsenic in cooked rice: effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract. *Environ. Pollut*, 2012. 162: p. 241-246.
153. Park, S., Park, C.H., Jang, J.S., Antecedent intake of traditional Asian-style diets exacerbates pancreatic b-cell function, growth and survival after Western-style diet feeding in weaning male rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2006. 17: p. 307-318.
154. Pradeep Alava , G.D.L., Filip Tack, Tine De Ryck, Tom Van De Wiele, Westernized diets lower arsenic gastrointestinal bioaccessibility but increase microbial arsenic speciation changes in the colon. *Chemosphere*, 2015. 119: p. 757-762.
155. Van de Wiele, T., Gallawa, C.M., Kubachka, K.M., Creed, J.T., Basta, N., Dayton, E.A., Whitacre, S., Du Laing, G., Bradham, K., Arsenic metabolism by human gut microbiota upon in vitro digestion of contaminated soils. *Environ. Health Perspect.*, 2010. 118: p. 1004-1009.
156. Narukawa, T., Inagaki, K., Kuroiwa, T., Chiba, K., The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC–ICP–MS. *Talanta*, 2008. 77: p. 427-432.

157. Alava, P., Tack, F., Laing, G.D., de Wiele, T.V., Arsenic undergoes significant speciation changes upon incubation of contaminated rice with human colon micro biota. *J. Hazard. Mater*, 2012b: p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.042>.
158. Alava, P., Du laing, G., Tack, F., Van De Wiele, T., Towards an optimal sample preparation procedure: Arsenic speciation is preserved during extensive grinding and pressurized extraction from rice. *Analytical Methods*, 2012a. 4(5): p. 1237-1243.
159. So-Young Byun, D.-B.K., Eunjung Kim, Curcumin ameliorates the tumor-enhancing effects of a high-protein diet in an azoxymethane-induced mouse model of colon carcinogenesis. *NUTRITION RESEARCH*, 2015. 35: p. 726-735.
160. Drechsel, D., Patel, M., Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med*, 2008. 44: p. 1873-1886.
161. Ahmad, I., Shukla, S., Kumar, A., Singh, B., Patel, D., Pandey, H., Singh, C., Maneb and paraquat-induced modulation of toxicant responsive genes in the rat liver: comparison with polymorphonuclear leukocytes. *Chem. Biol. Interact*, 2010. 188: p. 566-579.
162. Barlow, B., Lee, D., Slechta, D., Opanashuk, L., Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. *Neurotoxicology*, 2005. 26: p. 63-75.
163. Domico, L., Cooper, K., Bernard, L., Zeevalk, G., Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its concentration to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology*, 2007. 28: p. 1079-1091.
164. Domico, L., Zeevalk, Bernard, L., Cooper, K., Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology*, 2006. 27: p. 816-825.
165. Grosicka-Maciag, E., Kurpios-Piec, D., Szumiłło, M., Grzela, T., Rahden-Staron, I., Protective effect of N-acetyl-l-cysteine against maneb induced oxidative and apoptotic injury in Chinese hamster V79 cells. *Food Chem Toxicol*, 2011. 49: p. 1020-1025.

166. Zhou, Y., Shie, F., Piccardo, P., Montine, T., Zhang, J., Proteasomal inhibition induced by manganese ethylenebisdithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2004. 128: p. 281-291.
167. Goldner, W.S., Sandler, D.P., Yu, F., Hoppin, J.A., Kamel, F., Levan, T.D., Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *Am. J. Epidemiol*, 2010. 171: p. 455-464.
168. Corsini, E., Birindelli, S., Fustinoni, S., De Paschale, G., Mammone, T., Visentin, S., Galli, C., Marinovich, M., Colosio, C., Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005. 208: p. 178-185.
169. Soloneski, S., Gonzalez, M., Piaggio, E., Reigosa, M., Larramendy, L., Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.*, 2001. 514: p. 201-212.
170. Soloneski, S., Reigosa, M., Larramendy, L., Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro V. Abnormalities induced in the spindle apparatus of transformed and non-transformed mammalian cell lines. *Mutat. Res.*, 2003. 536: p. 121-129.
171. Tsang, M., Trombetta, L., The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes. *Toxicol. Ind. Health*, 2007. 7: p. 459-470.
172. Medjdoub, A., Merzouk, S., Merzouk, H., Chiali, F., Narce, F., Effects of mancozeb and metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2011. 101: p. 27-33.
173. Astiz, M., Alaniz, M., Marra, C., Antioxidant defense system in rat simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 2009a. 28: p. 465-473.
174. Belpoggi, F., Soffritti, M., Guarino, M., Lambertini, L., Cevolani, D., Maltoni, C., Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 2002. 982: p. 123-136.

175. Ksheerasagar, R., Kaliwal, B., Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 2003. 15: p. 9-17.
176. Nielsen, B., Larsen, E., Ladefoged, O., Lam, H., Neurotoxic effect of maneb in rats as studied by neurochemical and immunohistochemical parameters. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2006. 21: p. 268-275.
177. Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, F., Palozza, P., DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2006. 211: p. 87-96.
178. Corsini, E., Viviani, B., Birindelli, F., Gilardi, F., Torri, A., Codeca, I., Lucchi, L., Baresaghi, S., Galli, C., Marinovich, M., Colosio, C., Molecular mechanism underlying mancozeb-induced inhibition of TNF- $\alpha$  production. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2006. 212: p. 89-98.
179. Fitsanakis, V., Amarnath, V., Moore, J., Montine, K., Zhang, J., Montine, T., Catalysis of catechol oxidation by metal–dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002. 33: p. 1714-1723.
180. Astiz, M., Alaniz, M., Marra, C., Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2009b. 72: p. 2025-2032.
181. Lisa Hoffman, D.H., Ethylene bisdithiocarbamate pesticides cause cytotoxicity in transformed and normal human colon cells. *environmental toxicology and pharmacology*, 2012. 34: p. 556-573.
182. Hawkins LK, L.N., Kirn D. , Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol*, 2002. 3: p. 17-26.
183. Williams- Brown S, S.G., Epidemiology of cancer in the United States. *Semin Oncol Nurs*, 2005. 21(4): p. 236-242.
184. O., W., Oncolytic viruses as therapeutic agents. *Ann Med*, 2001. 33: p. 291-304.
185. A., P., Environmental exposure to bacteria and viruses may provide oncolytic protection against cancers, and declining exposure to infections may contribute to a rising incidence of cancer. *medical hypotheses*, 2007. 68: p. 558-561.

186. Norman KL, L.P., Reovirus as a novel oncolytic agent. *J. Clin Invest*, 2000. 105: p. 1035-1038.
187. Fernandez M, P.M., Markovic D, Barber G., Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J Virol*, 2002. 76(2): p. 895-904.
188. Moehler M, B.B., Weiskopf N, et al, Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther*, 2001. 8: p. 158-159.
189. Pawelek J, L.K., Bermudes D., Tumor targeted salmonella as a novel anticancer vector. *Cancer Res*, 1997. 57: p. 4537-4544.
190. Peng K, T.C., Galanis E, Kalli K, Hartmann L, Russell S, Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res*, 2002. 62: p. 4656-4662.
191. Grote D, R.S., Cornu T, Cattaneo R, Vile R, Poland G, et al., Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood*, 2001. 97(12): p. 3746-3754.
192. Edmunds W, B.M., The effect of vaccination on the epidemiology of varicella zoster virus. *J Infect*, 2002. 44: p. 211-219.
193. Vardas E, K.S., Isolation of measles virus from a naturally immune, asymptotically reinfected individual. *J Clinical Virol*, 1999. 13: p. 173-179.
194. Chang, A.H., Parsonnet, J, Role of bacteria in oncogenesis. *Clin. Microbiol. Rev*, 2010. 23: p. 837-857.
195. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D, Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*, 2011. 61 p. 69–90.
196. Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., Rhodes, J.M., Stintzi, A., Simpson, K.W., Hansen, J.J., Keku, T.O., Fodor, A.A., Jobin, C., Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*, 2012. 338: p. 120-123.
197. Alam, A., Leoni, G., Wentworth, C.C., Kwal, J.M., Wu, H., Ardita, C.S., Swanson, P.A., Lambeth, J.D., Jones, R.M., Nusrat, A., Neish, A.S., Redox signaling regulates commensal-mediated mucosal homeostasis



- and restitution and requires formyl peptide receptor 1. *Mucosal Immunol*, 2013.
198. Chiarugi, P., Pani, G., Giannoni, E., Taddei, L., Colavitti, R., Raugei, G., Symons, M., Borrello, S., Galeotti, T., Ramponi, G., Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for adhesion. *J. Cell Biol*, 2003. 161: p. 933-944.
  199. Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L.S., Hansen, J.M., Li, T., Yamoah, K., Pan, Z.-Q., Jones, D.P., Neish, A.S., Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J*, 2007. 26: p. 4457-4466.
  200. Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L.S., Kwon, Y.-M., Hanson, J.M., Neish, A.S., The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *J Immunol*, 2009. 182: p. 538-546.
  201. Swanson, P.A., Kumar, A., Samarin, S., Vijay-Kumar, M., Kundu, K., Murthy, N., Hansen, J., Nusrat, A., Neish, A.S., Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011. 108: p. 8803-8808.
  202. Wentworth, C.C., Alam, A., Jones, R.M., Nusrat, A., Neish, A.S., Enteric commensal bacteria induce extracellular signal-regulated kinase pathway signaling via formyl peptide receptor-dependent redox modulation of dual specific phosphatase 3. *Biol Chem*, 2011. 286: p. 38448-38455.
  203. Kim, J.J., Tao, H., Carloni, E., Leung, W.K., Graham, D.Y., Sepulveda, A.R., *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 2002. 123: p. 542-553.
  204. Machado, A.M.D., Figueiredo, C., Touati, E., Máximo, V., Sousa, S., Michel, V., Carneiro, F., Nielsen, F.C., Seruca, R., Rasmussen, L.J., *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res*, 2009. 15: p. 2995-3002.

205. Mirzaee, V., Molaei, M., Shalmani, H.-M., Zali, M.-R., Helicobacter pylori infection and expression of DNA mismatch repair proteins. *World J. Gastroenterol.*, 2008. 14: p. 6717-6721.
206. Park, D.I., Park, S.H., Kim, S.H., Kim, J.W., Cho, Y.K., Kim, H.J., Sohn, C.I., Jeon, W.K., Kim, B.I., Cho, E.Y., Kim, E.J., Chae, S.W., Sohn, J.H., Sung, I.K., Sepulveda, A.R., Kim, J.J., Effect of Helicobacter pylori infection on the expression of DNA mismatch repair protein. *Helicobacter*, 2005. 10: p. 179-184.
207. Yao, Y., Tao, H., Park, D.I., Sepulveda, J.L., Sepulveda, A.R., Demonstration and characterization of mutations induced by Helicobacter pylori organisms in gastric epithelial cells. *Helicobacter*, 2006. 11: p. 272-286.
208. Watson, P., Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Bernstein, I., Aarnio, M., Jarvinen, H.J., Myrhoj, T., Sunde, L., Wijnen, J.T., Lynch, H.T., The risk of extra-colonic, extraendometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J. Cancer*, 2008. 123: p. 444-449.
209. Kim, E.R., Selyutina, A.A., Buldakov, I.A., Evdokimova, V., Ovchinnikov, L.P., Sorokin, A.V, The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA-damaging stress. *Cell Cycle*, 2013. 12.
210. Weinberg, F., Chandel, N.S, Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell. Mol. Life Sci*, 2009. 66: p. 3663-3673.
211. Wheeler, J.M., Bodmer, W.F., Mortensen, N.J., DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*, 2000. 47: p. 148-153.
212. Kunkel, T.A., Erie, D.A, DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem*, 2005. 74: p. 681-710.
213. Balducci, L., Beghe, C., Cancer and age in the USA. *Crit. Rev. Oncol./Hematol*, 2001. 37: p. 137-145.
214. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J., Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin*, 2009. 59: p. 225-249.
215. Center, M.M., Jemal, A., Ward, E., International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009. 18: p. 1688-1694.

216. Iversen, L.H., Pedersen, L., Riis, A., Friis, S., Laurberg, S., Sørensen, H.T., Age and colorectal cancer with focus on the elderly: trends in relative survival and initial treatment from a Danish population-based study. *Dis. Colon Rectum*, 2005. 48: p. 1755-1763.
217. Jiang, S.X., Wang, X.S., Geng, C.H., Wang, G.Y., Altering trend of clinical characteristics of colorectal cancer: a report of 3607 cases. *Ai Zheng*, 2009. 28(54-56).
218. Hao, Y., Jemal, A., Zhang, X., Ward, E.M., Trends in colorectal cancer incidence rates by age, race/ethnicity, and indices of access to medical care, 1995–2004 (United States). *Cancer Causes Control*, 2009. 20: p. 1855-1863.
219. Ian A Cree, *Cancer biology Methods*, *Mol Biol*2011;731:1-11.
220. G Klein, Better understanding of the biology of cancer cells *Ugeskr Laeger*, 2000 Sep 25;162(39):5199-204.
221. Judith Meza-Junco et al, Molecular basis of cancer, *Rev Invest Clin*, 2006 Jan-Feb;58(1):56-70.
222. Teresa Paulsen, Discoveries of Extrachromosomal Circles of DNA in Normal and Tumor Cells, *Trends Genet*. 2018 Apr;34(4):270-278.
223. V D Brown et al, Cumulative effect of phosphorylation of pRB on regulation of E2F activity, 1999 May;19(5):3246-56.
224. A Mal, A Piotrkowski, M L Harter, Cyclin-dependent kinases phosphorylate the adenovirus E1A protein, enhancing its ability to bind pRb and disrupt pRb-E2F complexes, *J Virol*, 1996 May;70(5):2911-21.
225. Takeo Kishimoto Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF *Chromosoma*. 2015 Dec;124(4):417-28.
226. Xiangdong Hu, Xuejiao Jin, Xiuling Cao, Beidong Liu, The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Is a Cellular Ageing Regulator, *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 5;23(23):15327.
227. Susan Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
228. E Obeng, Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review, *Braz J Biol*. 2021 Oct-Dec;81(4):1133-1143.
229. Vogelstein, E.R.F.a.B., A genetic Model for Tumorigenesis. *Cell*, 1990. 61: p. 759-767.

230. Hanahan D., W.R., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011(4): p. 646-674.
231. Si, R., Cell cycle in Cancer, Principles and Practice of Oncology. Edited by DeVita VT, Jr, Hellman S and Rosenberg SA. Lippincott 7th Edition 2005: p. 83-94.
232. Kinzler KW, N.M., Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al, Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 1991. 253(5020): p. 661-665.
233. Groden J, T.A., Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al., Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991. 66(3): p. 589-600.
234. Science, W.I.o. 2008: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=E2F1>.
235. Nakamura Y, N.I., Kinzler KW, Vogelstein B, Miyoshi Y, Miki Y et al, Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli and sporadic colorectal tumors. Princess Takamatsu Symp, 1991. 22(285-292).
236. Giles RH, v.E.J., Clevers H., Caught up in a Wnt storm: Wnt signalincancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003. 1653(1): p. 1-24.
237. Saitoh T, M.T., Kato M., Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer. *Int J Mol Med*, 2002. 9(5): p. 515-519.
238. I., N., APC at a glance. *J Cell Sci*, 2004. 117(21): p. 4873-4875.
239. Bertario L, R.A., Sala P, Varesco L, Giarola M, Mondini P, et al., Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *J Clin Oncol*, 2003. 21(9): p. 1698-1707.
240. Soravia C, B.T., Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, et al., Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(6): p. 1290-1301.
241. Trimarchi JM, L.J., Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3: p. 11-20.
242. N., D., The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 1998. 12: p. 2245-2262.

243. DeGregori J, J.D., Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis. *Curr Mol Med*, 2006. 6: p. 739-748.
244. Polager S, G.D., E2F—at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol*, 2008. 18: p. 528-535.
245. Farra R., D.B., Baiz D., et al, Impairment of the Pin1/E2F1 axis in the anti- proliferative effect of bortezomib in hepatocellular carcinoma cells *Biochimie*, 2015. 112: p. 85-95.
246. Dimova DK, D.N., The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, 2005. 24: p. 2810-2826.
247. DeGregori J, L.G., Miron A, Jakoi L, Nevins JR., Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. 94: p. 7245-7250.
248. Wu X, L.A., p53 and E2F-1 cooperateto mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. 91: p. 3602-3606.
249. Xu M, S.K., Peng CY, Yee AS, Piwnica-Worms H., Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 1994. 14: p. 8420-8431.
250. Stevaux O, D.N., A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. 14: p. 684-691.
251. Martin M, M.L., Temming P,Rahmann S, Metz C,Bornfeld N,et al, Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet*, 2013. 45: p. 933-936.
252. Xu X , B.M., Jin VX, Rabinovich A, Oberley MJ, Green R ,et al, A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1 E2F4,and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members. *Genome Res* 2007. 17: p. 1550-1561.
253. Bieda M, X.X., Singer MA, Green R, Farnham P.J., Unbiased location analysis of E2F1- binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res*, 2006. 16: p. 595-605.
254. Stone S, J.P., Dayananth P, et al., Complex structure and regulation of the P16(MTS1) locus. *Cancer Res*, 1995. 55(14): p. 2988-2994.
255. Mao L, M.A., Bedi G, et al., A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res*, 1995. 55(14): p. 2995-2997.

256. Sherr, C.J., The INK4a/ARF networking in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(10): p. 731-737.
257. Kawamoto, H.E., T. Gotanda, H. Kubo, K. Nishiyama, M. Kawahara, M. Nakagawa, p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Bioch Bioph Res Commun*, 2006. 339: p. 790-796.
258. Sherr, C.J., Cancer cell cycles. *Science*, 1996. 274: p. 1672-1677.
259. D.E. Quelle, F.Z., R.A. Ashmund, C.J. Sherr, Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 1995. 83: p. 993-1000.
260. T. Kamijo, F.Z., M.F. Roussel, D.E. Quelle, J.R. Downing, R.A. Ashmun, G. Grosveld, C.J. Sherr, Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 1997. 91: p. 641-659.
261. W. Tao, A.J.L., p19ARF stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999. 96: p. 6937-6941.
262. H. Hirai, C.J.S., Interaction of D-type cyclins with a novel myb-like transcription factor, DMP1. *Mol Cell Biol*, 1996. 16: p. 6457-6467.
263. G.M. Balaburski, R.D.H., M.E. Murphy, p53 and ARF: unexpected players in autophagy. *Trends Cell Biol*, 2010. 20: p. 363-369.
264. D.P. Frazier, R.D.K., F. Kai, D. Maglic, T. Sugiyama, R.L. Morgan, E.A. Fry, S.J. Lagedrost, G. Sui, K. Inoue, Dmp1 physically interacts with p53 and positively regulates p53's stability, nuclear localization, and function. *Cancer Res*, 2012. 72: p. 1740-1750.
265. R. Sreeramaneni, A.C., M. McMahon, C.J. Sherr, K. Inoue, Ras–Raf–Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Mol Cell Biol*, 2005. 25: p. 220-232.
266. S. Bates, A.C.P., P. Clarke, F. Stott, G. Peters, R.L. Ludwig, K.H. Vousden, E2F-1 regulation of p14ARF links pRB and p53. *Nature*, 1998. 395: p. 124-125.
267. M.P. Tschan, E.A.F., A. Haimovici, C. Britschgi, B.A. Moser, J. Jin, V. A. Reddy, D.A. Sheeter, K. M. Fischer, P. Sun, B.E. Torbett, Human DMTF1 $\beta$  antagonizes DMTF1 $\alpha$  regulation of the p14<sup>ARF</sup> tumor

- suppressor and promotes cellular proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, 2015. 1849(9): p. 1198-1208.
268. D. Maglic, D.B.S., J.M. Cline, E.A. Fry, A. Mallakin, P. Taneja, D.L. Caudell, M.C. Willingham, G. Sui, K. Inoue, DMP1 $\beta$ , a splice isoform of the tumour suppressor DMP1 locus, induces proliferation and progression of breast cancer. *J. Pathol*, 2015. 236: p. 90-102.
  269. Schonk DM, K.H., van Drunen E, van Dalen CH, Geurts van Kessel AH, Verheijen R, Ramaekers FC, Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum. Genet*, 1989. 83(3): p. 297-299.
  270. Bullwinkel J, B.-L.B., Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T, Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Cell*, 2006. 206(3): p. 624-635.
  271. Rahmzadeh R, H.G., Gerdes J, Scholzen T, Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif*, 2007. 40(3): p. 422-430.
  272. Scholzen T, G.J., The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Cell. Physiol.*, 2000. 182(3): p. 311-322.
  273. Vanneste, D., Takagi, M., Imamoto, N., Vernos, I., The role of Hk1p2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr. Biol.*, 2009. 19: p. 1712-1717.
  274. A. Hemalatha, T.N.S., M.L. Harendra Kumar, Expression of vimentin inbreast carcinoma, its correlation with Ki67 and other histopathological param-eters,. *Indian J. Cancer*, 2013. 50: p. 189-194.
  275. R. Herrero, P.E.C., M. Schiffman, M.C. Bratti, A. Hildesheim, J. Morales, et al., Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cer-vical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica,. *J. Infect. Dis*, 2005. 191: p. 1796-1807.
  276. E. Stankiewicz, S.C.K., D.M. Prowse, E. Ktori, J. Cuzick, L. Ambroisine, et al., HPV infection and immunochemical detection of cell-cycle markers in verrucous carcinoma of the penis,. *Mod. Pathol.*, 2009. 22: p. 1160-1168.
  277. C. Ungureanu, S.T., D. Socolov, G. Anton, M.S. Mihailovici, Evaluation of p16INK4 and Ki67 proteins expression in cervical intraepithelial

- neoplasia and their correlation with HPV-HR infection. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*, 2010. 114: p. 823-828.
278. Booth, D.G.e.a., Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Life*, 2014. 3: p. 16-41.
  279. Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R. & Ellenberg, J., Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*, 2002. 108: p. 83-96.
  280. Guylen S., B.K., Politi Z.A., Muller-Reichert T., Neumann B., Poser I., Ellenberg J., Hyman A.A., Gerlich W.D., Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 2016. 535: p. 308-312.
  281. A. Longatto Filho, M.L.U., N.K. Shirata, S.M.M. Pereira, G.M. Namiyama, C.T. Kanamura, et al., Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2005. 24: p. 118-124.
  282. Whitfield, M.L., George, L. K., Grant, G. D. & Perou, C. M, Common markers of proliferation. *Nature Rev. Cancer*, 2006. 6: p. 99-106.
  283. Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., Hayes, M. M. & Gelmon, K. A., Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*, 2010. 11: p. 174-183.
  284. Buxant F., A.V., Simon P., Fayt I., Noël J.C., Ki-67 immunostaining activity is higher in positive axillary lymph nodes than in the primary breast tumour. *Breast Cancer Res Treat*, 2002. 75(1): p. 1-3.
  285. Trihia H., M.S., Price K., Gelber R.D., Golouh R., Goldhirsch, A., et al., Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors- a surrogate marker? *Cancer Res*, 2003. 97(5): p. 1321-1331.
  286. Inwald E.C., K.-S.M., Hofstadter F., Zeman F., Koller M., Gerstenhauer M., Ortmann, O., Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. 139(2): p. 539-552.



287. Tawfik K., K.B.F., Davis M.K., Fan F., Tawfik O, Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant. *Hum. Pathol*, 2013. 44(1): p. 39-46.
288. Dowsett, M., Nielsen, T.O., A'hern, R., Bartlett, J., Coombes, R.C., Cuzick, J., et al.,, Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *J. Natl. Cancer Inst*, 2011. 103: p. 1656-1664.
289. Lech G, Slotwinski R, Krasnodebski IW. The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma*. 2013.
290. Chen H, Sun X, Ge W, Qian Y, Bai R, Zheng S. A seven-gene signature predicts overall survival of patients with colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016.
291. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(4):252-71.
292. Relationship Between ABO Blood Group and the Risk of Colorectal Cancer: A Retrospective Multicenter Study Abdullah Al-Sawat et al. *J Clin Med Res*. 2022 Mar; 14(3):119-125.
293. ABO and Rh blood groups and risk of colorectal adenocarcinoma, Yuksel Urun et al. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(12):6097-100.
294. Cigarette smoke promotes colorectal cancer through modulation of gut microbiota and related metabolites, Xiaowu Bai et al. *Gut*. 2022 Dec;71(12):2439-2450.
295. Cigarette Smoking Associated with Colorectal Cancer Survival: A Nationwide, Population-Based Cohort Study, Yu-Min Huang et al. *J Clin Med*. 2022 Feb; 11(4): 913.
296. Energy balance and colon cancer—Beyond physical activity. Slattery M.L., Potter J., Caan B., Edwards S., Coates A., Ma K.N., Berry T.D. *Cancer Res*. 1997;57:75–80.
297. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: A meta-analysis. Cai S., Li Y., Ding Y., Chen K., Jin M. *Eur. J. Cancer Prev*. 2014;23:532–539.
298. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review, Nora B. Henrikson, *Ph Genet Med*. 2015 Sep; 17(9): 702–712.

299. Association Between Thyroid Disorders and Colorectal Cancer Risk in Adult Patients in Taiwan, Abby L'Heureux et al, JAMA Netw Open. 2019;2(5): e193755.
300. Effects of thyroid hormone imbalance on colorectal cancer carcinogenesis and risk - a systematic review, Olga Rostkowska et al, Endokrynol Pol, 2019;70(2):190-197.
301. Biochemical Markers of Colorectal Cancer – Present and Future Wojciech Jelski<sup>1</sup> and Barbara Mroczko, Cancer Manag Res. 2020; 12: 4789–4797.
302. Lu Zhang , Jerry W Shay Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer J Natl Cancer Inst. 2017 Aug 1;109(8):djw332.
303. Timothy Yen , Peter P Stanich, Lisen Axell, Swati G Patel, Margaret P Adam, Ghayda M Mirzaa, Roberta A Pagon, Stephanie E Wallace, Lora JH Bean, Karen W Gripp, Anne Amemiya APC-Associated Polyposis Conditions, GeneReviews, 1998 Dec 18
304. Ianari, A. et al. 'Pro-apoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein', Cancer Cell, 2009, 15(3), pp. 184–194.
305. Li, L. et al. 'Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review).', Mol Med Rep., 2015, 11(3), pp. 1566–72.
306. Ma, X. et al. 'Overexpression of E2F1 Promotes Tumor Malignancy And Correlates with TNM Stages in Clear Cell Renal Cell Carcinoma', PLoS ONE, 2013, 8(9), p. e73436.
307. Chen, H.-Z. et al. 'Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control', Nat Rev Cancer, 2009, 9(11), pp. 785–797.
308. Donehower, L. et al. 'Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas', Cell Reports, 2019, 28(5), pp. 1370-1384.e5.
309. Pützer, B. M. (2007) 'E2F1 death pathways as targets for cancer therapy', J Cell Mol Med, 11(2), pp. 239–251.
310. Miller, I. et al. 'Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence', Cell Rep. 2018, 24(5), pp. 1105-1112.e5.
311. Sun, X. and Kaufman, P. (2018) 'Ki-67: more than a proliferation

- marker', *Chromosoma*, 127(2), pp. 175–186.
312. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression, *Cell Death Differ.* 2021 Dec;28(12):3357-3370.
  313. Use of the Ki67 promoter to label cell cycle entry in living cells. Zamboni AC. *Cytometry A.* 2010 Jun;77(6):564-70.
  314. Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs. Estaller A, Kessler M, Wehrend A, Hirschberger J, Neumann S. *Animals (Basel).* 2022 May 14;12(10):1263.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### Βιογραφικό σημείωμα ερευνητή

#### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

**Όνοματεπώνυμο:** Θεόδωρος Λούτας  
**Όνομα συζύγου:** Πηνελόπη  
**Όνομα πατρός:** Γεράσιμος  
**Όνομα μητρός:** Χαριτίνη  
**Ημερομηνία γέννησης:** 10 Νοεμβρίου 1979  
**Τέκνο πολύτεκνης οικογένειας**  
**Οικογενειακή κατάσταση:** Έγγαμος – Με δύο Τέκνα  
**Βαθμός:** Πλωτάρχης  
**Ειδικότητα:** Νοσηλευτής (ΥΝ)  
**A.M.:** N-271

#### ΣΠΟΥΔΕΣ

1. Απόφοιτος (1997) του τριταξίου Γ' Λυκείου Πατρών με βαθμό 18 1/11 και αγωγή "Κοσμιωτάτη".
2. Πτυχιούχος (2003) της Σχολής Αξιωματικών Νοσηλευτικής με βαθμό 88,43%.
3. Κάτοχος Άδειας ασκήσεως επαγγέλματος Νοσηλευτή για όλη την επικράτεια.
4. Κάτοχος Πιστοποιητικού Καρδιοπνευμονικής Αναζωογόνησης.
5. Κάτοχος Πιστοποιητικού Ναυτικής Ιατρικής.
6. Κάτοχος Πιστοποιητικού Καταδυτικής και Υπερβαρικής Ιατρικής και Νοσηλευτικής.
7. Απόφοιτος του 24<sup>ου</sup> Σχολείου Αυτοδυτών-Καταδυτικής Ιατρικής της Σχολής Υποβρυχίων Καταστροφών του Πολεμικού Ναυτικού 2005.
8. Κάτοχος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Σπουδών με ειδίκευση στη Χειρουργική Νοσηλευτική από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2009.
9. Κάτοχος Ειδικότητας Χειρουργικής Νοσηλευτικής από το Υπουργείο Υγείας 2016.
10. Απόφοιτος της Ναυτικής Σχολής Πολέμου 2020.
11. Υποψήφιος κάτοχος Διδακτορικού Διπλώματος Σπουδών με ειδίκευση στη Χειρουργική Νοσηλευτική από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

#### ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

1. Από αποφοίτησής μου (2002) μέχρι το 2008, έχω υπηρετήσει στο Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών ως υπεύθυνος Ορθοπαιδικού Τμήματος, Χειρουργικού Τμήματος, Παθολογικού Τμήματος, Καρδιολογικού Τμήματος, Χειρουργείου και Μονάδας Εντατικής Θεραπείας.

2. Το 2004 συμμετείχα ενεργά στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας. Ήμουν τοποθετημένος στην Πολυκλινική του Ολυμπιακού Χωριού όπου και για τις υπηρεσίες μου έλαβα προσωπική ευχαριστήρια επιστολή από το Διευθυντή Ιατρικών Υπηρεσιών Αθήνα 2004 και μου απονεμήθηκε Δίπλωμα σε ένδειξη τιμής, για "την εθνική φιλοτιμία και την αφοσίωση στο καθήκον" που υπέδειξα, από τον Α/ΓΕΕΘΑ.
3. Στις 8 Φεβρουαρίου 2005 μετατέθηκα στη Φ/Γ ΨΑΡΑ .
4. Επιλέχθηκα από το Πολεμικό Ναυτικό λόγω των γνώσεών μου σε ξένες γλώσσες και συμμετείχα στο συνέδριο MARCOMET 2005.
5. Στις 12 Αυγούστου 2008 μετατέθηκα στη Σχολή Αξιωματικών Νοσηλευτικής όπου υπηρέτησα ως Εκπαιδευτής 3<sup>ου</sup> έτους.
6. Από το 2010 μέχρι και το 2020, έχω υπηρετήσει στο Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών ως υπεύθυνος Ορθοπαιδικού Τμήματος, Χειρουργικού Τμήματος, Χειρουργείου και Μονάδας Εντατικής Θεραπείας και Προϊστάμενος Ομάδας Διαχείρισης Ελκών του NNA.
7. Από το 2020 μέχρι και σήμερα υπηρετώ ως Προϊστάμενος Αναισθησιολογικού Τμήματος και Υπεύθυνος Χειρουργείου Ναυτικού Νοσοκομείου Κρήτης

#### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:**

1. 2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Φοιτητών Νοσηλευτικής Παρουσίαση Εργασίας (12/2000).
2. Διημερίδα με θέμα επείγουσα Νοσηλευτική-Μαζικές Καταστροφές-Ετοιμότητα που οργανώθηκε στο Πολεμικό Μουσείο (9/2001).
3. 1<sup>η</sup> Ημερίδα μητρικού θηλασμού (11/2001).
4. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Φοιτητών Νοσηλευτικής-Παρουσίαση Εργασίας (12/2001).
5. Ημερίδα με θέμα "Ζώντας με την Αφασία" (5/2002).
6. 29<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο-Παρουσίαση Εργασίας (5/2002).
7. Ημερίδα με θέμα "Καρδιαγγειακά Νοσήματα" (6/2002).
8. Ημερίδα με θέμα "Νέες τάσεις ολιστικής αντιμετώπισης γυναικολογικού καρκίνου και του καρκίνου του μαστού (06/2002).
9. Ημερίδα με θέμα "Σεξουαλική Διαπαιδαγώγηση στην Ελλάδα" (06/2004).
10. 2<sup>η</sup> Ημερίδα Ιατρικής της Εργασίας στο 401 ΓΣΝΑ (12/2002).
11. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Φοιτητών Νοσηλευτικής- Παρουσίαση Εργασίας (12/2002).
12. 30<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο-Παρουσίαση Εργασίας (05/2003).
13. 9<sup>η</sup> Νοσηλευτική Ημερίδα στο 401 ΓΣΝΑ (11/2003).
14. 8<sup>ο</sup> Πολυθεματικό Ιατρικό Συνέδριο του NNA (01/2004).
15. 2<sup>ο</sup> Συμπόσιο Επείγουσας και Εντατικής Ιατρικής στο 424 ΓΝΑ (06/2004).
16. 9<sup>ο</sup> Συνέδριο Βαλκανικής Επιτροπής Στρατιωτικής Ιατρικής που πραγματοποιήθηκε στην Αττάλεια της Τουρκίας (06/2004).
17. 60<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ορθοπαιδικής (10/2004).
18. 4ο Πανελλήνιο και 3ο Πανευρωπαϊκό Νοσηλευτικό Συνέδριο (03/2011).
19. 16<sup>th</sup> CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICAL COMMITTEE/BUCHAREST/ROMANIA (06/2011) On-Compliance in Therapeutical Treatment of Patients on Dialysis and Kidney Transplantation.
20. 17<sup>th</sup> CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICAL COMMITTEE/BELGRADE/SERBIA (05/2012) Sexually Transmitted Diseases

(STDs): Knowledge, Attitudes and Behaviors Among Navy Personnel, Emphasis on HPV.

21. 17th CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICAL COMMITTEE/BELGRADE/SERBIA (05/2012) Measurement of Quality of Life in Stroke Patients.
22. 18th CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICAL COMMITTEE/TURKEY (06/2013). Dermatomycosis in Military School Cadets, Risk Factors and Countermeasures.
23. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, Η επίδραση της παχυσαρκίας στην ανάπτυξη λοίμωξης χειρουργικού πεδίου-Παρουσίαση Εργασίας (05/2013).
24. 7<sup>ο</sup> Συνέδριο Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών και κλινικό φροντιστήριο-Παρουσίαση Εργασίας (10/2015).
25. 20<sup>η</sup> Επιστημονική Ημερίδα με θέμα Αντιμετώπιση Κρίσεων στο Ελληνικό Νοσοκομείο (11/2015).
26. Εκπαιδευτική Συνάντηση με θέμα ο Ρόλος του Επαγγελματία Υγείας στον Σ.Δ. (12/2015).
27. Ημερίδα “Social Entrepreneurship: People-Places-Partnerships” Ομιλητής (5/5/2018).
28. Πολυθεματική Ημερίδα Πολεμικού Ναυτικού-Παρουσίαση Εργασίας (3/2019).
29. 8<sup>ο</sup> Συνέδριο Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών και κλινικό φροντιστήριο-Παρουσίαση Εργασίας (10/2017).
30. 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, Μεταβολές του APC σε ασθενείς με Καρκίνο Παχέος Εντέρου και έκφραση των παραγόντων E2F1 και P14ARF-Παρουσίαση Εργασίας (10/2021).
31. 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΜΕΔΙΠ, Χρήση Πολυεξανίδης στην Περιποίηση Τραύματος Διαβητικού Ποδιού-Παρουσίαση Εργασίας (2/2022).
32. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, Επέμβαση Υαλοειδεκτομής στο Ναυτικό Νοσοκομείο Κρήτης-Παρουσίαση Εργασίας (5/2022).
33. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, Περιποίηση Τραύματος με χρήση Πολυεξανίδης-Παρουσίαση Εργασίας (5/2022).

### **ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ:**

1. Προεδρίο Οργανωτικής Επιτροπής Νοσηλευτικής Ημερίδας Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών (3/2019).
2. Προεδρίο Οργανωτικής Επιτροπής 33ου Πανελληνίου Συνεδρίου Περιεγχειρητικής Νοσηλευτικής ΣΥ.Δ.ΝΟ.Χ (9/2022).

### **ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ:**

1. 2<sup>nd</sup> Balkan Military Medical Paper Award, 18th CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICAL COMMITTEE/TURKEY 22-26/06/2013. Dermatomycosis in Military School Cadets, Risk Factors and Countermeasures.
2. 1<sup>st</sup> National Military Medical Paper Award, 18th CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICAL COMMITTEE/TURKEY 22-26/06/2013. Dermatomycosis in Military School Cadets, Risk Factors and Countermeasures.

3. Εύφημος Μνεία, από τον Κ. ΑΓΓΕΕΘΑ, για την 2<sup>η</sup> θέση της επιστημονικής εργασίας στο 18th CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICAL COMMITTEE/TURKEY 22-26/06/2013.
4. Υπότροφος Ιδρύματος Αλέξανδρος Ωνάσης.
5. Υπότροφος Ελληνικής Εταιρείας Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:**

1. Αγγλικά: Advance Certificate in English of University of Cambridge.
2. Ιταλικά: Certificato di Conoscenza della Lingua Italiana Livello B 2 CELI 3 Università per Stranieri Perugia.
3. Γερμανικά: Zertifikat Deutsch als Fremdsprache aus Goethe Institut.

### **ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ:**

Πολλή καλή γνώση στη χρήση Η/Υ και συγκεκριμένα των προγραμμάτων Word, Power Point, Excel, Internet Explorer και χρήση E-mail. Χρήση προγραμμάτων ανάλυσης δεδομένων πχ SPSS.

### **ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:**

1. Από το Σεπτέμβριο 2008 έως τον Ιούνιο του 2020, μαθήματα θεωρίας και εργαστηρίου, στο 3<sup>ο</sup> έτος του τμήματος Νοσηλευτικής του ΕΚΠΑ. Θέμα μαθημάτων: Χειρουργική Νοσηλευτική Ι και ΙΙ. Επιτήρηση φοιτητών και μεταπτυχιακών φοιτητών. Συμβολή σε πολλές εργασίες και ανάλυση ποσοτικών και ποιοτικών δεδομένων.
2. Από το Σεπτέμβριο του 2014 εκπαιδευτής στο Ι.Ε.Κ. ΕΚΑΒ.

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:**

1. Dermatomycosis in Military School Cadets: Prevalence, Risk Factors and Countermeasures, Balkan Military Medical Review Oct - Dec 2013; 16(4): 399 - 411
2. Side effects from the use of azathioprine in Crohn's disease: A systematic review. Prog Health Sci 2016, Vol 6, No 1
3. Exploring the Relationship between Crucial Clinical and Histopathological Parameters in Cutaneous Malignant Melanoma, With the Dereglulation of the Apoptotic Pathway and the Expression of Telomerase, Annals of Clinical Research and Trials, 8/2017, vol1, 004.

### **ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:**

1. Balch A. Phyllis. Συμπληρωματικές Θεραπείες - Διατροφική Θεραπευτική. Επιμέλεια: Θεοδοσοπούλου - Ευθυμίου Ελένη, Γκίονης Γεώργιος. ISBN:978-960-372-191-8. Έτος έκδοσης: 2013.

### **ΧΟΜΠΥ:**

1. Μέλος στο Σώμα Ελλήνων Προσκόπων από το 1992.
2. 3<sup>η</sup> θέση σε Πανελλήνιο Πρωτάθλημα Ξιφασκίας 2003
3. Κολύμβηση, Ταξίδια, Μουσική.



## **Α Έκθεση προόδου Υποψήφιου Διδάκτορα**

**ΠΡΟΣ:** ΕΚΠΑ/ Σ.Ε.Υ.  
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

Λούτας Θεόδωρος  
του Γερασίμου (ΑΜ: 003)  
Νοσηλεύτης  
Υποψήφιος Διδάκτορας  
Αθήνα

### **ΘΕΜΑ: Α ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ**

Μετά την εκτενή αναζήτηση της βιβλιογραφίας, πραγματοποιήθηκε προγραμματισμός των σταδίων και βημάτων της έρευνας.

Στην πρώτη φάση της μελέτης πραγματοποιήθηκε εύρεση και ανάλυση της διεθνούς και εγχώριας βιβλιογραφίας για αναζήτηση των εννοιών, επιδημιολογικών δεδομένων, παραγόντων κινδύνου, σύγχρονων θεραπευτικών τεχνικών.

Στην πορεία, ακολούθησε η λήψη συγκατάθεσης από τον ασθενή, τόσο για την λήψη ιστού του παχέος εντέρου κατά την χειρουργική επέμβαση, όσο και για την χρήση των δεδομένων για τις ανάγκες της διδακτορικής διατριβής.

Οι ερωτήσεις που έγιναν στον ασθενή χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε τα προσωπικά στοιχεία του ασθενούς, καθώς και αποτελέσματα εξετάσεων και στη δεύτερη ομάδα συγκαταλέγονται ερωτήσεις σχετικά με την πάθηση και την πιθανή συσχέτιση παραγόντων κινδύνου.

Όλα αυτά τα δεδομένα θα επεξεργαστούν στο τέλος της μελέτης, εφόσον έχει γίνει η καταγραφή όλων των αποτελεσμάτων των εξετάσεων και των κυττάρων που έχουν συλλεχθεί, για τις ανάγκες της μελέτης αυτής.

Μετά Τιμής

ΘΕΟΔΟΣΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΜΑΡΙΟΛΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΑΪΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΛΟΥΤΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

## **Έκθεση προόδου Υποψήφιου Διδάκτορα**

**ΠΡΟΣ:** ΕΚΠΑ/ Σ.Ε.Υ.  
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

Λούτας Θεόδωρος  
του Γερασίμου (ΑΜ: 003)  
Νοσηλεύτης  
Υποψήφιος Διδάκτορας  
Αθήνα

### **ΘΕΜΑ: ΈΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ**

Σας αναφέρω ότι κατά το χρονικό διάστημα μέχρι και σήμερα ολοκληρώθηκε η αναζήτηση διεθνούς βιβλιογραφίας, σε θέματα σχετικά, με τα νέα δεδομένα που προέκυψαν. Η συγγραφή της διατριβής προχωράει με εντατικό ρυθμό για τη έγκαιρη παράδοσή της.

Προκειμένου να κατανοήσουμε την λειτουργία και έκφραση των παραγόντων E2F1 και P14ARF, σε ασθενείς με CA παχέως εντέρου, χρειάστηκε να γίνει αναζήτηση στο εξωτερικό, για τα αντίστοιχα αντιδραστήρια.

Με ταυτόχρονη συνεργασία του Βιολογικού Κέντρου Ερευνών του Στρατού Ξηράς και του Ερευνητικού Εργαστηρίου του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ανευρέθησαν, τα πλέον κατάλληλα αντιδραστήρια· συγκεκριμένες ουσίες, για την ανάλυση και την μελέτη των συγκεντρωθέντων δειγμάτων, που ταυτίζονται πλήρως, με την ανίχνευση του μονοπατιού καρκινογένεσης που ερευνάται.

Βρίσκεται στο τέλος της η δεύτερη φάση, επεξεργασίας και ανάλυσης δείγματος, του ενδοθηλιακού ιστού των ασθενών, με τη διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας. Είχε γίνει πρόβλεψη ώστε να εξασφαλιστούν 10 πλακάκια ενδοθηλιακού ιστού, για κάθε ασθενή ξεχωριστά, για περαιτέρω μοριακή ανάλυση και τυχών ανάγκη εξακρίβωσης δεδομένων.

Δεύτερο δείγμα, για τους ίδιους πάντα ασθενείς, θα επεξεργαστεί εκτός από τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και με μοριακές μεθόδους. Η συγκεκριμένη διαδικασία θα ακολουθηθεί και για τα τρία γονίδια (APC-P14ARF-

E2F1) ενώ μελετάται και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki67) των ιστών των ασθενών.

Ορισμένα από τα δεδομένα, τα οποία έχουν ανακύψει μέχρι σήμερα, φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσουν ερευνητικά στοιχεία αναφοράς, μετά από δημοσιεύσεις στον επιστημονικό τύπο και ανακοινώσεις σε ανάλογα συνέδρια και επιστημονικές συναντήσεις.

Επιφυλάσσομαι, για περαιτέρω ενημέρωσή σας, σε σχέση με την μελέτη και την ανάπτυξη, των δεδομένων της έρευνας.

Μετά Τιμής

ΘΕΟΔΟΣΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΜΑΡΙΟΛΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΑΪΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΛΟΥΤΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

## **Έκθεση προόδου Υποψήφιου Διδάκτορα**

**ΠΡΟΣ:** ΕΚΠΑ/ Σ.Ε.Υ.  
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

Λούτας Θεόδωρος  
του Γερασίμου (ΑΜ: 003)  
Νοσηλεύτης  
Υποψήφιος Διδάκτορας  
Αθήνα

### **ΘΕΜΑ: ΈΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ**

Σας αναφέρω ότι, κατά το χρονικό διάστημα μέχρι και σήμερα, ολοκληρώθηκαν σημαντικά πειράματα που λάμβαναν χώρα στο Εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Σας ενημερώνω ότι έχουν σχεδόν ολοκληρωθεί όλες οι εργαστηριακές διαδικασίες ανάλυσης των γονιδίων της διατριβής.

Ταυτόχρονα μελετάται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των ανθρώπινων ιστών, που έχουν παρθεί από τους ασθενείς, μέσα από την πρωτεΐνη Ki-67. Προχωρώντας την έρευνα, μελετάται η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων με την μέθοδο Tunnel. Τέλος, μικροσκοπικά, ελέγχεται η διαδικασία της γήρανσης με μέθοδο SBB staining.

Την ίδια στιγμή, η ψηφιακή φωτογράφιση των πλακιδίων των ιστών, ασθενών με Καρκίνο Παχέος Εντέρου και η συγγραφή της διατριβής βαίνουν προς το τέλος τους.

Επιφυλάσσομαι, για περαιτέρω ενημέρωσή σας, σε σχέση με την μελέτη και την ανάπτυξη, των δεδομένων της έρευνας.

Μετά Τιμής

ΘΕΟΔΟΣΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΜΑΡΙΟΛΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΑΪΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ

ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΛΟΥΤΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

## Αίτηση Έγκρισης Εκπόνησης Μελέτης

**ΠΡΟΣ:**

Λούτας Θεόδωρος  
του Γερασίμου  
Διδακτορικός Φοιτητής  
ΕΚΠΑ/Τμήμα Νοσηλευτικής  
Αθήνα,  
Συν.: Ερευν. Πρωτ.

**ΘΕΜΑ :** Αίτηση Έγκρισης Εκπόνησης Μελέτης

1. Παρακαλώ, όπως αξιολογήσετε το Ερευνητικό Πρωτόκολλο, που σας αποστέλλετε και εγκρίνετε τη συμπλήρωση του επισυναπτόμενου ιστορικού ασθενή, από ασθενείς του Νοσοκομείου σας και λήψη τμημάτων ιστών από τον ερωτώντα ασθενή, κατά τη διάρκεια προγραμματισμένης χειρουργικής επέμβασής του.

2. Η μελέτη διεξάγεται στα πλαίσια διδακτορικής διπλωματικής εργασίας στο Τμήμα Νοσηλευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της καθηγήτριας Κας Θεοδοσοπούλου Ελένης.

3. Παρακαλώ για τις ενέργειές σας.

## Ενημερωτικό Σημείωμα

### **ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

Αγαπητέ / ή, Κύριε / Κυρία

Ονομάζομαι Λούτας Θεόδωρος και είμαι Διδακτορικός Φοιτητής στο Τμήμα Νοσηλευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στα πλαίσια της διδακτορικής διπλωματικής εργασίας μου με θέμα:

**«ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ APC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ**

**ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ E2F1 ΚΑΙ P14ARF»,**

έχω αναλάβει την εκπόνηση μελέτης, πάνω σε ανθρώπινους ιστούς. Πρόκειται για ανάλυση καρκινικών κυττάρων στο εργαστήριο και διερεύνηση συσχέτισης συγκεκριμένων γονιδίων, με τον Καρκίνο του Παχέος Εντέρου. Τα τμήματα ιστών θα ληφθούν από το παρασκεύασμα που θα αφαιρεθεί από εσάς, κατά τη διάρκεια της προγραμματισμένης χειρουργικής επέμβασης με τον Ιατρό σας. Τα συμπεράσματα θα δημοσιευθούν σε επιστημονικά περιοδικά και συνέδρια και θα γίνουν αντικείμενο μελέτης για περαιτέρω έρευνα στον τομέα του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου.

Για το λόγο αυτό, σας παρακαλώ να συμμετέχετε στη σχετική έρευνα, συμπληρώνοντας με ειλικρίνεια το έντυπο προσωπικών στοιχείων, αφού προηγουμένως υπογράψετε το επισυναπτόμενο ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΝΑΙΝΕΣΗΣ.

Διευκρινίζονται ρητά τα ακόλουθα:

1. Η συμμετοχή στην έρευνα είναι εθελοντική και εμπιστευτική.
2. Η συμπλήρωση του ερωτηματολογίου γίνεται ανώνυμα. (Δε σχετίζεται η υπογραφή σας στο έντυπο συναίνεσης με το ιστορικό ασθενή)
3. Το ονοματεπώνυμο σας δεν πρόκειται να δημοσιοποιηθεί με κανέναν τρόπο.
4. Οι απαντήσεις σας έχουν εμπιστευτικό χαρακτήρα και θα κοινοποιηθούν μόνον συνοπτικά αποτελέσματα, που θα προκύψουν από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.
5. Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης τα έντυπα συναίνεσης και τα ερωτηματολόγια θα καταστραφούν.
6. Σύμφωνα με τον **Νόμο 3418/2005** δεν επιτρέπεται να προβεί κάποιος στην εκτέλεση οποιασδήποτε ιατρικής πράξης χωρίς την προηγούμενη



συναίνεση του ασθενή. Έχετε δικαίωμα για πλήρη, σαφή και κατανοητή ενημέρωση. Έχετε αναφαίρετο δικαίωμα να αρνηθείτε τη συμμετοχή σας στη συγκεκριμένη έρευνα.

Σας ευχαριστώ εκ των προτέρων για τη συμμετοχή σας και για το χρόνο που μου αφιερώσατε.

Λούτας Θεόδωρος  
Νοσηλεύτης

## Έντυπο Συναίνεσης

### ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΝΑΙΝΕΣΗΣ

Με το παρόν δηλώνω, ότι δέχομαι να συμμετέχω στην διδακτορική έρευνα με θέμα :

**«ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ APC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ E2F1 ΚΑΙ P14ARF»,**

που διεξάγεται από τον Κο Λούτα Θεόδωρο, Διδακτορικό Φοιτητή στο Τμήμα Νοσηλευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συναινώ, τμήματα ιστών να ληφθούν από το παρασκεύασμα που θα αφαιρεθεί από τον Ιατρό μου, κατά τη διάρκεια της προγραμματισμένης χειρουργικής επέμβασής μου. Τα συμπεράσματα θα δημοσιευθούν σε επιστημονικά περιοδικά και συνέδρια και θα γίνουν αντικείμενο μελέτης για περαιτέρω έρευνα στον τομέα του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου.

Για τη συναίνεσή μου αυτή, ενημερώθηκα ότι:

1. Η συμμετοχή μου στην έρευνα είναι εθελοντική και εμπιστευτική.
2. Η συμπλήρωση του ερωτηματολογίου γίνεται ανώνυμα. (Δε σχετίζεται η υπογραφή μου στο έντυπο συναίνεσης με το ιστορικό ασθενή)
3. Το ονοματεπώνυμό μου δεν πρόκειται να δημοσιοποιηθεί με κανέναν τρόπο.
4. Οι απαντήσεις μου έχουν εμπιστευτικό χαρακτήρα και θα κοινοποιηθούν μόνον συνοπτικά αποτελέσματα, όπως αυτά θα προκύψουν από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.
5. Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης τα έντυπα συναίνεσης και τα ερωτηματολόγια θα καταστραφούν.
6. Σύμφωνα με τον **Νόμο 3418/2005** δεν επιτρέπεται να προβεί κάποιος στην εκτέλεση οποιασδήποτε ιατρικής πράξης, χωρίς την προηγούμενη συναίνεση του ασθενή. Έχω δικαίωμα για πλήρη, σαφή και κατανοητή ενημέρωση. Έχω αναφαίρετο δικαίωμα να αρνηθώ τη συμμετοχή μου στη συγκεκριμένη έρευνα.

.....

(Όνοματεπώνυμο)

.....

(Ημερομηνία)

.....

(Υπογραφή)

## Έντυπο Ιστορικού Ασθενή.

Α/α:.....Ονοματεπώνυμο ασθενή:.....

Ηλικία:..... Διεύθυνση:.....

Τηλέφωνο:..... Ύψος:..... Βάρος:.....

ΔΜΣ:.....

Αριθμός Φακέλου:..... Αριθμός Ιστολογικής:.....

Λοιπά

στοιχεία:.....

Ημ/νία Εισαγωγής:..... Ένδειξη Εισαγωγής:.....

Τύπος Χειρ/ου:..... Ομάδα Αίματος:.....

Ατομικό ιστορικό σοβαρών νόσων ή θεραπευτικών παρεμβάσεων:

.....  
.....

Παρούσα νόσος:.....

Διάγνωση:.....

Κλινικά ευρήματα:.....

.....  
.....

Ακτινομορφολογικά ευρήματα:.....

.....  
.....

Αιματολογικά-Ανοσολογικά-Βιοχημικά ευρήματα:.....

.....  
.....

Ευρήματα καλλιέργειών:.....

.....  
.....

Ευρήματα βιοψιών:.....

.....  
.....

Θεραπευτική αγωγή:.....

.....  
.....

Πορεία-Έκβαση νόσου:.....

.....  
.....