



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ – ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΒΑΣΙΛΗΣ ΓΟΡΓΟΥΛΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ K-RAS ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΜΑΡΓΕΤΗΣ
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2017

Στους γονείς μου.....

Στους δασκάλους μου.....

“ Από την επίπονη έρευνά μου, με τις πολλές σκοτεινές ατραπούς της, γνωρίζω πόσο δύσκολο είναι να κάνει κανείς ένα σωστό βήμα, έστω και πολύ μικρό, στο δρόμο που οδηγεί στην κατανόηση του τι είναι πραγματικά σημαντικό ”

Albert Einstein (1879 -1955)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
Όρκος του Ιπποκράτη	5-6
Ευχαριστίες	7-8
Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής	9
Βιογραφικό Σημείωμα	10-15
Abstract	16
Περίληψη	17
Ευρετήριο επικουρικών εργαλείων της έρευνας	18
Γενικό μέρος	19-57
1. Επιδημιολογία καρκίνου παχέος εντέρου και ορθού	20
2. Μοριακά μονοπάτια στην ορθοκολική καρκινογένεση	24
3. Μοριακοί γονότυποι ορθοκολικού καρκίνου	32
4. Η βιολογία της φυσιολογικής κολονικής κρύπτης	36
5. Η παθολογία της δυσπλαστικής και της υπερπλαστικής κολονικής κρύπτης	40
6. Οι αλληλουχίες από το φυσιολογικό βλεννογόνο προς τον ορθοκολικό καρκίνο και ο ρόλος του APC	43
7. Υπάρχουν αναπάντητα ερωτήματα ή ενστάσεις σχετικά με το αποδεκτό πρότυπο ορθοκολικής καρκινογένεσης;	47
8. Η αλληλεπίδραση και η αλληλεξάρτηση των κύριων ογκογόνων μονοπατιών (Wnt και MAPK) της ορθοκολικής καρκινογένεσης	49
9. Φυσιολογικός ρόλος και ρύθμιση του πρωτοογκογονιδίου Ras	52
10. Γιατί η K-ras μετάλλαξη συνιστά δυνητικά ένα εναλλακτικό μοριακό εναρκτήριο γεγονός στην ορθοκολική καρκινογένεση;	56
Ειδικό μέρος	58-132
1. Το θεωρητικό υπόβαθρο και το σκεπτικό της μελέτης	59
2. Αρχικό πλάνο της έρευνας	61
3. Στόχοι της έρευνας	63
4. Βιοηθική έγκριση του πρωτοκόλλου της έρευνας	65
5. Δεδομένα ασθενών και υγιών εθελοντών. Κριτήρια αποκλεισμού.	66
6. Συλλογή, μονιμοποίηση και επεξεργασία ιστικών δειγμάτων. Κοπή ιστολογικών τομών.	71
7. Διαγνωστικός ιστοπαθολογικός έλεγχος. Ομαδοποίηση των ιστών.	75
8. Μεθοδολογία απομόνωσης του DNA	78
9. Μεθοδολογία ανίχνευσης των μεταλλάξεων στο K-ras	81
10. Η στατιστική επεξεργασία και τα πορίσματα των αποτελεσμάτων	90
11. Ποιες είναι οι καινοτομίες της παρούσας έρευνας ;	112
12. Είναι εφικτό η παρούσα έρευνα να τροποποιήσει το αποδεκτό μοντέλο σε υποομάδα ορθοκολικής καρκινογένεσης ;	114
13. Το προτεινόμενο πρότυπο σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης : το θεωρητικό γονιδιακό δίπολο	122
14. Γιατί η ανίχνευση K-ras μεταλλάξεων στον μη καρκινικό ιστό του παχέος εντέρου και του ορθού είναι κλινικά σημαντική;	127
15. Περιορισμοί της μελέτης. Κατευθυντήριες στρατηγικές μελλοντικής έρευνας.	130
16. Συμπεράσματα	132
Παράρτημα : Εργαστηριακά πρωτόκολλα	133-137
Βιβλιογραφία	138-150

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ – ΑΡΧΑΙΟ ΚΕΙΜΕΝΟ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωὔτεος ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαμάτων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχεόντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ – ΑΠΟΔΟΣΗ ΣΤΗ ΝΕΟΕΛΛΗΝΙΚΗ

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον γιατρό, και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και όλους τους θεούς και όλες τις θεές μάρτυρες βάζω πως θα τηρήσω τον όρκο μου αυτόν και αυτό το συμβόλαιο, όσο θα διατηρώ τις δυνάμεις μου και την κρίση μου.

Τον μεν διδάξαντά με την τέχνη αυτήν θα τιμώ όσο και τους δικούς μου γονείς και θα τον κάνω κοινωνό του δικού μου βίου και θα του οφείλω τα νενομισμένα. Τους δε γιους του θα θεωρώ ίσους προς αδελφούς μου και θα τους διδάξω την τέχνη αυτήν, αν νιώθουν την ανάγκη να τη μάθουν, χωρίς μισθό και χωρίς έγγραφο συμβόλαιο. Θα διδάξω τα προφορικά και γραπτά μαθήματα και όλη γενικά την υπόλοιπη εξάσκηση του επαγγέλματος μόνο στους δικούς μου γιους, στους γιους του διδασκάλου μου και σε μαθητές που με όρκο και συμβόλαιο, κατά τους άγραφους νόμους της ιατρικής, θα έχουν συνδεθεί μαζί μου. Σε κανέναν άλλον.

Θα χρησιμοποιήσω τις θεραπευτικές δίαιτες μόνο προς όφελος των ασθενών, όσο μπορώ και όπως κρίνω ορθό, να αποφύγω δε κάθε βλάβη και αδικία. Δεν θα χορηγήσω κανένα θανατηφόρο φάρμακο, όποιος κι αν μου το ζητήσει, και δεν θα δώσω καμία τέτοια συμβουλή. Επίσης, δεν θα δώσω σε καμία γυναίκα φάρμακο εκτρωτικό. Αγνό και θείο θα διατηρήσω όλον μου τον βίο, καθώς και την τέχνη μου.

Να μην ευνουχίσω δε κανέναν, όπως το ζητούν, αφήνοντας την εργασία αυτή για άλλους που ασχολούνται με τέτοιες πράξεις. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα εισέρχομαι μόνο προς όφελος των ασθενών, μακριά από κάθε θεληματική αδικία και βλάβη. Και μακριά από αφροδίσιες πράξεις, επί γυναικείων σωμάτων και αντρικών, ελευθέρων ή δούλων. Όσα κατά τις θεραπείες (ή και πέραν της ασχολίας μου, στην καθημερινή ζωή των ανθρώπων) ακούσω ή δω, για τα οποία δεν πρέπει να λέγεται τίποτε, θα σιωπώ θεωρώντας τα ως εμπιστευτικά μυστικά. Όσο τον όρκο μου, λοιπόν, θα τηρώ και δεν θα τον παραβαίνω, είτε να έχω καλό όνομα και στη ζωή και στη τέχνη μου και να με εκτιμούν για πάντα όλοι οι άνθρωποι. Εάν δε παραβώ τον όρκο μου και επιορκήσω, να πάθω τα αντίθετα.



Ιπποκράτης ο Κώος (460 - 370 π. Χ.)
Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αιτία για την απόφαση της εκκίνησης της πολύχρονης αυτής διαδρομής αποτελεί η αξία που αποδίδω, από τα πρώτα βήματα της ιατρικής μου πορείας, στην ανακάλυψη της νέας γνώσης, όχι ως αυτοσκοπού, αλλά ως εφαλτηρίου για την εφαρμογή καινούργιων δεδομένων, χρήσιμων στην κλινική πράξη. Απαρχή αυτής της ερευνητικής μου δραστηριότητας ήταν η βαθύτατη επιθυμία μου να εμβαθύνω στα μυστικά της μοριακής καρκινογένεσης και η εσώτατη ανάγκη μου για ανεύρεση στοιχείων που συμβάλλουν στην πρόληψη ή/και στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Αναλογιζόμενος τον αφορισμό του Σόλωνα ότι «η επιστήμη είναι κρυμμένη μέσα σε μια αδιαπέραστη σκοτεινιά, βρίσκεται έξω απ' τη δική μας σφαίρα, σ' έναν τόπο μεγαλοπρεπή, που χρησιμεύει σαν όριο σ' όλα τα πράγματα», υπερπήδησα τις δυσκολίες που θα πρόεκυπταν νομοτελειακά. Αυτή η υπέρβαση επιτελέσθηκε με τη στήριξη, τη βοήθεια και τη συνδρομή εξαίρετων επιστημόνων· την ευγνωμοσύνη μου σε αυτούς θα ήθελα να καταθέσω εδώ.

Αρχικά, θα ήθελα να αναφερθώ στη φίλη και συνάδελφο κυρία Ηρώ Γρηγοράκη, Αναισθησιολόγο, τέως Επίκουρη Καθηγήτρια της Νοσηλευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ, με μακρόχρονη διδακτική, ερευνητική και κλινική εμπειρία. Η κυρία Γρηγοράκη με παρότρυνε να ξεκινήσω την περιπέτεια της αναζήτησης της καινούργιας γνώσης, με ενθάρρυνε στην προσπάθειά μου, με έφερε σε επαφή με επιστήμονες, των οποίων το έργο τυγχάνει ευρύτατης αποδοχής και με εισήγαγε στο δρόμο της έρευνας με αληθινό ενδιαφέρον. Την ευχαριστώ από καρδιάς.

Ακολουθώντας, νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή της Νοσηλευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ κύριο Θεόδωρο Μαριόλη-Σαψάκο, Χειρουργό. Σύμβουλος από τα πρώτα μου ερευνητικά βήματα, με κατεύθυνε με επαγωγικό τρόπο και με βοήθησε να αυτενεργήσω. Μαζί επιλέξαμε τόσο την κατεύθυνση όσο και τον προορισμό. Αρωγός και πολύτιμος συνεργάτης, με βοήθησε να μπολιάσω την ερευνητική μου δραστηριότητα με το πνεύμα του κλινικού ιατρού· με ώθησε να επιλέξω το πεδίο εργασίας που να συνδυάζει εργαστηριακή κατεύθυνση, πρωτοτυπία και εφαρμοστικότητα στην κλινική πράξη. Μου μεταλαμπάδευε αδιάκοπα - σε κάθε εύκολο και δύσκολο στάδιο αυτής της διαδρομής - το δυναμισμό του, την αισιοδοξία του και την εμπειρία του. Οι συμβουλές του ήταν καίριες, εύστοχες και χρήσιμες. Η ηθική του στήριξη συνεχής και άδολη. Όντας αυστηρός, δίκαιος και ταυτόχρονα γενναϊόδωρος, μου έδειξε και μου άνοιξε το δρόμο προς την κατάκτηση της ερευνητικής γνώσης. Του είμαι ειλικρινά ευγνώμων.

Θέλω εδώ ιδιαιτέρως να σταθώ στη συνδρομή του κυρίου Αθανασίου Κοτσίνα, Επίκουρου Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ. Φιλικός από την πρώτη στιγμή, μοιραζόταν μαζί μου με πατρικό ενδιαφέρον τις ατραπούς που είναι θεμιτό να ακολουθεί ένας επιστημονικός νους στην αναζήτηση της πρωτότυπης γνώσης· το τοπίο των δυσνόητων πεδίων της Μοριακής Γενετικής και της Μοριακής Καρκινογένεσης έγινε διανυγές με τη βοήθειά του και κατέστη αρωγός στην προσπάθειά μου να κατανοήσω του τι είναι το πραγματικά σημαντικό στο δαιδαλώδη λαβύρινθο της γνώσης. Διορατικός και έμπειρος στην αναζήτηση της πληροφορίας που θα ήταν εφικτό να εφαρμοσθεί κλινικά, επέβλεψε όλες τις εργασίες της διατριβής με γνώμονα την επιστημονικότητα και το κλινικό όφελος της παγκόσμιας κοινότητας. Τον ευχαριστώ από ψυχής.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά και ιδιαίτερα την κυρία Μυρσίνη Κουλούκουσα-Γιαννιού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, η οποία ήταν το επιβλέπον μέλος ΔΕΠ της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η κυρία Κουλούκουσα με ενθάρρυνε διαρκώς στην προσπάθειά μου, με βοήθησε να κατανοήσω τις απαιτητικές πτυχές της επιστημονικής έρευνας και ήταν συμπαράστατής μου στη διαδικασία επεξεργασίας των

αποτελεσμάτων και διεξαγωγής των συμπερασμάτων. Μου έδωσε, τέλος, την ευκαιρία να επικοινωνήσω τόσο τις τεκμηριωμένες επιστημονικές γνώσεις όσο και τα πορίσματα της έρευνάς μου σε προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ.

Στον Καθηγητή κύριο Βασίλη Γοργούλη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και επικεφαλής της Ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης, αξίζει ιδιαίτερη μνεία. Με την εμπειρία της πολύχρονης, της εκτενέστατης και ευρέως αποδεκτής συνεισφοράς του στον εμπλουτισμό της διεθνούς βιβλιογραφίας με χρηστική επιστημονική γνώση, επέδειξε ειλικρινές και ουσιαστικό ενδιαφέρον για την πρόοδο των εργασιών της διατριβής μου και μέριμνα για την ανάδειξη σημαντικών αποτελεσμάτων. Παρέσχε ακόμη τις πολυεπίπεδες δυνατότητες του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας στην υπηρεσία όλων των εργασιών, των απαιτούμενων για την ολοκλήρωση της διατριβής. Τέλος, ως μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, μου δίνει τη δυνατότητα να αναπτύξω ενώπιόν του τα νεότερα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα. Του είμαι αληθινά ευγνώμων.

Στην κυρία Κυριακή Παύλου, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος ΕΔΙΠ και ενεργό μέλος του Τμήματος Μοριακής Διαγνωστικής του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του ΕΚΠΑ, θέλω «να αποδώσω τα του Καίσαρος» : με εκπαίδευσε με ζήλο και επιμέλεια σε όλες τις μοριακές τεχνικές που επρόκειτο να χρησιμοποιήσω για την επεξεργασία των δειγμάτων, μου έδωσε την ευκαιρία να εισχωρήσω και να δραστηριοποιηθώ σε πεδία της ιατρικής έρευνας που μέχρι προ τινος ήταν εκτός του ορίζοντα σκέψης μου και με βοήθησε να συνειδητοποιήσω την αξία της λεπτομέρειας, ως προϋπόθεση για την τελειοποίηση της ερευνητικής διαδικασίας. Χωρίς τη δική της πολύτιμη αρωγή, το «τεχνικό» και «πρακτικό» σκέλος της παρούσας έρευνας, το απόλυτα απαραίτητο για την εξαγωγή των πορισμάτων, θα ήταν στην πράξη μη εφικτό. Την ευχαριστώ θερμότατα από ψυχής.

Στον κύριο Παναγιώτη Σκανδαλάκη, Καθηγητή Ανατομίας και Χειρουργικής Ανατομίας του ΕΚΠΑ, στον κύριο Δημήτρη Κλέτσα, Διευθυντή Ερευνών του Εργαστηρίου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και γήρανσης στο “ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος”, καθώς και στην κυρία Σοφία Χαβάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες, διότι από τη θέση των μελών της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής μου παρέχουν την ευκαιρία να εκθέσω με δημόσιο λόγο την ερευνητική μου δραστηριότητα και να υποστηρίξω ενώπιόν τους τη διδακτορική μου διατριβή.

Πριν κλείσω το παρόν εδάφιο, θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΕΔΙΠ, τους μόνιμους εργαζόμενους και τους εξωτερικούς συνεργάτες του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για την ανιδιοτελή συνδρομή τους αναφορικά με επιμέρους τομείς της αρμοδιότητάς τους που ήταν αναγκαίοι για την προώθηση του ερευνητικού μου έργου, καθώς και το Γαστρεντερολόγο κύριο Σπύρο Βρακά για την πολύτιμη συνδρομή του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της έρευνας.

Τέλος, από τη θέση αυτή θέλω να ευχαριστήσω θερμά τόσο τους γονείς μου, γιατί από μικρή ηλικία με γαλούχησαν με ανώτερες αξίες και αρχές και έβαλαν στην ψυχή μου το σπόρο της αναζήτησης της «Ιθάκης» εις το διηνεκές όσο και τη σύζυγό μου, Ερασμία Κοΐλιαρη, Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, η οποία, εκτός από την ηθική της συμπαράσταση καθόλη τη διάρκεια της μακρόχρονης αυτής δοκιμασίας, μου φώτισε μερικές από τις δυσερμήνευτες πτυχές της κοπιώδους πορείας της αναζήτησης της χρήσιμης γνώσης.

Αθήνα, Ιούλιος 2017

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Θέμα : Μελέτη των K-RAS μεταλλάξεων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Γνωστικό αντικείμενο : Ογκολογία - Μοριακή Βιολογία

Υποψήφιος Διδάκτωρ : Μαργέτης Νικόλαος, Ιατρός, Γαστρεντερολόγος

Χώρος εκπόνησης : Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Επιβλέπον Μέλος ΔΕΠ : Κουλούκουσα-Γιαννιού Μυρσίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Κουλούκουσα-Γιαννιού Μυρσίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
2. Κοτσίνας Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
3. Μαριόλης – Σαψάκος Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Νοσηλευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ενδιάμεσοι σταθμοί προς την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής

Ημερομηνία υποβολής αρχικής αιτήσεως	Φεβρουάριος 2011
Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής	Ιούνιος 2011
Ημερομηνία καθορισμού του θέματος	Ιανουάριος 2012
Ημερομηνία έγκρισης του πρωτοκόλλου της διατριβής από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής	Φεβρουάριος 2012
Ημερομηνία κατάθεσης της πρώτης προόδου	Νοέμβριος 2012
Ημερομηνία κατάθεσης της δεύτερης προόδου	Φεβρουάριος 2015
Ημερομηνία τροποποίησης του θέματος	Ιούλιος 2015
Ημερομηνία κατάθεσης της τρίτης προόδου	Νοέμβριος 2015
Ημερομηνία αποδοχής ξενόγλωσσας δημοσίευσης	Μάιος 2017
Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής	Ιούνιος 2017
Ημερομηνία ορισμού της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής	Ιούνιος 2017
Ημερομηνία υποστήριξης της διδακτορικής διατριβής	Ιούλιος 2017

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Σκανδαλάκης Παναγιώτης, Καθηγητής
2. Γοργούλης Βασίλειος, Καθηγητής
3. Κλέτσας Δημήτριος, Διευθυντής Ερευνών
4. Κουλούκουσα-Γιαννιού Μυρσίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
5. Κοτσίνας Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής
6. Μαριόλης - Σαψάκος Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής
7. Χαβάκη Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Ημερομηνία γέννησης : 5 Αυγούστου 1970

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος

Υπηκοότητα: Ελληνική

Επιστημονικά ενδιαφέροντα: Θεραπευτική και Διαγνωστική Ενδοσκόπηση ανωτέρου και κατώτερου πεπτικού συστήματος, Ογκολογία, Διαγνωστική και Θεραπευτική Ενδοσκοπική Υπερηχοτομογραφία, Ηπατολογία, Επείγουσα Ιατρική

Οικία : Γ. Γεννηματά 46, Πάτημα Χαλανδρίου, Τ : 6945-592568

Εργασία :

- “ΕΥΡΩΚΛΙΝΙΚΗ ΑΘΗΝΩΝ”, Αθανασιάδου 9, Αμπελόκηποι, Ενδοσκοπικό Τμήμα.
Τ : 2106416450, Fax : 210 6416444
- Ιατρείο Ευρωκλινικής : Τσόχα 24, 3^{ος} όροφος, Τ : 210 6416359 , Fax : 210 6416662
- Ιατρείο : Γ. Γεννηματά 46, Πάτημα Χαλανδρίου, Τ : 211 7005476, Fax : 2117700046
- Εξωτερικός Συνεργάτης ΔΘΚΑ «ΥΓΕΙΑ», Ερυθρού Σταυρού 4, Μαρούσι

E-mail: nmargetis@yahoo.gr

Εκπαίδευση

Ιούνιος 2011 - Ιούλιος 2017 : Υποψήφιος Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, με θέμα που αφορά στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου

Απρίλιος 2014 : Εκπαίδευση στην Ηπατολογία, επιτυχής ολοκλήρωση του κύκλου σπουδών του 7^{ου} Σχολείου Κλινικής Ηπατολογίας, το οποίο διοργανώθηκε από την Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Ήπατος, Νοέμβριος 2013 - Απρίλιος 2014 (27 CME credits)

Νοέμβριος 2005 – Μάιος 2006 : Εξειδίκευση στη διαγνωστική και θεραπευτική Ενδοσκοπική υπερηχοτομογραφία (EUS, EUS-FNA) και στη Διακοιλιακή υπερηχοτομογραφία των οργάνων του Γαστρεντερικού Συστήματος. Νοσοκομείο Αθηνών «Γ. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ»

Ιούνιος 2001 – Ιούλιος 2005 : Ειδίκευση – εξάσκηση στη Γαστρεντερολογία και Ηπατολογία, ως Ειδικευόμενος Ιατρός, 1^ο Νοσοκομείο ΙΚΑ Αθηνών, Μελίσσια, τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Γαστρεντερολογίας (Νομαρχία Αθηνών, 7855/27-9-2005)

Απρίλιος 2002 - Μάιος 2002 : Εκπαίδευση στη διαγνωστική και θεραπευτική ενδοσκόπηση, Τμήμα Γαστρεντερολογίας και Ηπατολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Karolinska, Στοκχόλμη, Σουηδία

Μάρτιος 2001: Εξάσκηση στην αντιμετώπιση του τραύματος και επιτυχείς εξετάσεις στο πρόγραμμα A.T.L.S. (Advanced Trauma Life Support), score 90 %

Μάιος 1999 – Νοέμβριος 2000: Ολοκλήρωση της εξάσκησης στην Εσωτερική Παθολογία, ως Ειδικευόμενος Ιατρός, Νοσοκομείο Αμαλία Φλέμιγκ, Μελίσσια

Οκτώβριος 1998 – Απρίλιος 1999 : Εξάσκηση στην Καρδιολογία, ως μέρος της ειδίκευσης στην Εσωτερική Παθολογία, Νοσοκομείο Αμαλία Φλέμιγκ

Μάιος 1998 - Ιούλιος 1998 : Εξάσκηση στην Εσωτερική Παθολογία, ως Ειδικευόμενος Ιατρός, 401 Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών

Σεπτέμβριος 1989 - Ιούλιος 1995 : Φοιτητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών, επιλογή μέσω Πανελληνίων εξετάσεων, βαθμός πτυχίου 7,38

Ιούλιος 1988 : Απόφοιτος Γενικού Λυκείου

Πιστοποιητικά και Άδειες

Σεπτέμβριος 2015 : Academic IELTS (International English Language Testing System) Certificate, grade C1

Μάρτιος 2012 : Fellow of the European Board of Gastroenterology and Hepatology (Ευρωπαϊκό δίπλωμα Γαστρεντερολογίας και Ηπατολογίας)

Νοέμβριος 2006 : Τακτικό μέλος της ΕΓΕ (Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία) και της ΕΠΕΓΕ (Επαγγελματική Ένωση Γαστρεντερολόγων Ελλάδας)

Οκτώβριος 2006 : Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Υπερήχων
Αύγουστος 2006 : Certificate ECDL στους H/Y (Excel, Word)
Ιούλιος 2006 : Άδεια διενέργειας διακοιλιακού & ενδοσκοπικού υπερηχογραφήματος στα όργανα της Γαστρεντερολογίας με (Αρ. αδεία ΚΕ.Σ.Υ. Υ7α/Γ.Π. 60598)
Σεπτέμβριος 2005 : Απόκτηση του τίτλου της Ειδικότητας της Γαστρεντερολογίας
Ιούλιος 2003: Σουηδική Άδεια ασκήσεως Ιατρικού επαγγέλματος (BEVIS OM LEGITIMATION, No 700805, Socialstyrelsen)
Απρίλιος 2003: Πιστοποίηση ορθής Ιατρικής πρακτικής
Απρίλιος 2003: Βεβαίωση πρακτικής άσκησης
Ιούνιος 2002: Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής
Ιούλιος 1998: Μέλος Ιατρικού συλλόγου Αθηνών, αριθμός μέλους 045344
Αύγουστος 1995: Ελληνική Άδεια ασκήσεως Ιατρικού επαγγέλματος
Μάιος 1987: Certificat de langue française
Ιούνιος 1986 : First Certificate in English

Κλινική και Ενδοσκοπική εμπειρία

Απρίλιος 2006 - σήμερα : Ιδιώτης Γαστρεντερολόγος-Ενδοσκόπος-Ηπατολόγος, Χαλάνδρι
Μάρτιος 2017 – σήμερα : Διευθυντής Γαστρεντερολόγος «ΕΥΡΩΚΛΙΝΙΚΗ ΑΘΗΝΩΝ»
Μάρτιος 2017 – σήμερα : Εξωτερικός συνεργάτης ΔΘΚΑ «ΥΓΕΙΑ»
Φεβρουάριος 2013 – Μάρτιος 2017 : Ιδιώτης Ενδοσκόπος – Γαστρεντερολόγος - Ηπατολόγος, Παροικία Πάρου
Φεβρουάριος 2014 – Ιανουάριος 2017 : Εξωτερικός Συνεργάτης, «ΙΑΤΡΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΜΑΡΟΥΣΙΟΥ»
Οκτώβριος 2005 – Φεβρουάριος 2017 : Εξωτερικός Συνεργάτης, «ΕΥΡΩΚΛΙΝΙΚΗ ΑΘΗΝΩΝ»
Νοέμβριος 2006 - Φεβρουάριος 2017 : Επιμελητής Γαστρεντερολόγος, ΔΘΚΑ «ΥΓΕΙΑ»
Νοέμβριος 2005 - Οκτώβριος 2010 : Εξωτερικός Συνεργάτης «ΑΘΗΝΑΪΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ»
Νοέμβριος 2005 – Οκτώβριος 2006 : Εφημερεύων Ιατρός στα Επείγοντα Εξωτερικά Παθολογικά Ιατρεία και στα Παθολογικά Τμήματα των Νοσοκομείων: «ΥΓΕΙΑ» και «ΕΥΡΩΚΛΙΝΙΚΗ ΑΘΗΝΩΝ» .
Μάιος 2009-Ιούνιος 2014 : Εξωτερικός Συνεργάτης «ΛΕΥΚΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥ ΑΘΗΝΩΝ»
Φεβρουάριος 2006 – Νοέμβριος 2011 : Ενεργό μέλος των SOS ΙΑΤΡΩΝ, Επείγουσα Εξωνοσοκομειακή Ιατρική.
Ιούνιος 2001 – Ιούλιος 2005 Ειδικευόμενος στη Γαστρεντερολογία και Ηπατολογία, 1^ο Νοσοκομείο ΙΚΑ Αθηνών.
Απρίλιος 1999 – Νοέμβριος 2000: Ολοκλήρωση της εκπαίδευσης στην Εσωτερική Παθολογία, Α΄ Παθολογική Κλινική, Νοσοκομείο Αμαλία Φλέμιγκ.
Οκτώβριος 1998 – Απρίλιος 1999: Ειδικευόμενος Ιατρός στην Καρδιολογία (Β΄ Καρδιολογική Κλινική, Μονάδα Εμφραγμάτων), Νοσοκομείο Αμαλία Φλέμιγκ.
Μάιος 1998 – Ιούλιος 1998: Ειδικευόμενος στην Εσωτερική Παθολογία (Β΄ Παθολογική Κλινική), 401 Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών.
Ιανουάριος 1997 – Ιούλιος 1998: Ιατρός των Ελληνικών Ενόπλων Δυνάμεων
Οκτώβριος 1995- Δεκέμβριος 1996: Υπηρεσία Υπαίθρου (Κ.Υ. Κλειτορίας, Αχαΐα και Π.Ι. Λουτρόπολης Θερμής του Κ.Υ. Καλλονής Λέσβου).

Δημοσιεύσεις

2017: K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas. In Vivo. 2017 Jul – Aug ; 31(4) : 527-542.
2008: Proteomics and genomics in Gastroenterology, medical journal of HYGEIA Hospital “ΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΑΛΕΚΤΑ”, Volume B, 18, pp 510-515
2008: Anal Fissure: Pathogenesis and treatment strategies, Medical journal of the Professional Union of Greek Gastroenterologists ENDOSCOPISIS, VOLUME 8, pp 12-16

2007: Correlation between esophageal contraction amplitude and lower esophageal sphincter pressure in patients with nutcracker esophagus, "Diseases of the esophagus". 2007; 20(2):151-154

2007: Helicobacter pylori infection in asymptomatic HIV seropositive and seronegative patients, "AIDS Research and human retroviruses", AIDS Res Hum Retroviruses. 2007 May; 23 (5)709-712

2006: Causes of non-attendance at an open-access endoscopy outpatient clinic, "Endoscopy" 2006 Apr; 38(4):427

2005: Contributor of the Volume of the 8th Thematic Congress of Intensive Therapy "Intensive Therapy and Emergency Medicine: Trauma". The object of study was: «Diagnostic approach to the injured patient: Ultrasound in abdominal injury», pp 401-418

2005: Diagnostic evaluation of the injured patient: Ultrasound in abdominal trauma, at the 8th Congress of Intensive Care on the multiinjured patient, 251 General Hospital of Air Force, Athens

2003: Elevated Intraesophageal Pressure in Patients with Achalasia: A common and important Manometric finding, "Digestive Diseases and Sciences" Vol 48, pp 2242-2263

2002: The Alcoholic and the Non-alcoholic Steatohepatitis (Review), «The Gastroenterological Chronicles» (Greek Medical Journal), 2002; 11

Συμμετοχή στη συγγραφή βιβλίου

2010 : Επιμέλεια της Ελληνικής έκδοσης των κεφαλαίων της Γαστρεντερολογίας και Ηπατολογίας στο βιβλίο "HARRISON'S : PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE – 17th edition", Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου

Εκλαϊκευμένες ομιλίες (25)

Ιούνιος 2014 - Δεκέμβριος 2016 : Μηνιαίες εκλαϊκευμένες ομιλίες στους κατοίκους του Δήμου Πάρου, με θεματολογία την πρόληψη των καρκίνων του γαστρεντερικού συστήματος και την αξία της διατροφής στα νοσήματα του πεπτικού σωλήνα, του ήπατος, των χοληφόρων και του παγκρέατος.

Απρίλιος 2013 : Ομιλία στο Δήμο Περιστερίου, με θέμα : " Λειτουργική δυσπεψία : μία σχέση με παρελθόν ή ένας δεσμός με μέλλον ; "

Δεκέμβριος 2012 : Ομιλία σε εσπερίδα που διοργάνωσε ο Δήμος Αχαρνών, με θέμα : " HPV και πρωκτός. Πώς προλαμβάνεται ο καρκίνος του πρωκτού; "

Ενεργός συμμετοχή σε Συνέδρια

Παρακολούθηση

Άνω των 250 Ελληνικών και άνω των 70 Διεθνών Ιατρικών Συνεδρίων (1991-2017)

Προφορικές ανακοινώσεις, ομιλίες και προεδρεία (18)

Μάρτιος 2015 : Ομιλία στο 14^ο Πολυθεματικό Ιατρικό Συνέδριο του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών με θέμα : "Πρωκτός και HPV λοίμωξη"

Οκτώβριος 2014 : Ομιλία στο συνέδριο «Κινητικές διαταραχές του εντέρου-φυτοθεραπευτικές πρακτικές» που διοργάνωσε η «Ελληνική Εταιρεία Εθνοφαρμακολογίας» στην Κύμη Ευβοίας, με θέμα : "Η σημασία της αλληλεπίδρασης του άξονα εγκεφάλου-εντέρου, των εντερικών νευρωνικών κυκλωμάτων και του μικροβιακού πληθυσμού στην εντερική λειτουργία και δυσλειτουργία".

Οκτώβριος 2014 : Ομιλία στο συνέδριο «Κινητικές διαταραχές του εντέρου-φυτοθεραπευτικές πρακτικές» που διοργάνωσε η «Ελληνική Εταιρεία Εθνοφαρμακολογίας» στην Κύμη Ευβοίας, με θέμα : "Πρόοδοι στην παθοφυσιολογία και τη φαρμακοθεραπεία του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου και της χρόνιας δυσκοιλιότητας"

Ιούνιος 2013 : Διάλεξη στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ με θέμα : “Μοριακά μονοπάτια και γενετικοί παράγοντες στην παθοφυσιολογία και την αντιμετώπιση της γαστροοισοφαγικής παλινδρομικής νόσου”

Σεπτέμβριος 2012 : Πρόεδρος σε 1 στρογγυλή τράπεζα (Πρόοδοι στην πρόληψη του καρκίνου) και σε 2 διαλέξεις («Η ανάγκη για αξιόπιστα στατιστικά στοιχεία στη μάχη εναντίον του καρκίνου» και «Η συμβολή της Ογκογηριατρικής στην πολιτική ανίχνευσης του καρκίνου στα άτομα μεγάλης ηλικίας» στο «1^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γεώργιος Ν. Παπανικολάου : Η πρόληψη του καρκίνου», Κύμη Ευβοίας, 9^{ος}/2012

Σεπτέμβριος 2012 : Ομιλία στο «1^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γεώργιος Ν. Παπανικολάου : Η πρόληψη του καρκίνου», Κύμη Ευβοίας, 21-23/9/2012 με θέμα “ HPV και πρωκτός. Προλαμβάνεται ο καρκίνος του πρωκτού; ”

Μάρτιος 2010 : Ομιλία στην εκπαιδευτική ημερίδα «Σύγχρονες απόψεις στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού» που διοργάνωσε η Γ΄ Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στα Καμένα Βούρλα. Θέμα ομιλίας : “Η θέση της κολονοσκόπησης και του EUS στη διάγνωση και σταδιοποίηση του Ca παχέος εντέρου με έμφαση στο Ca ορθού”.

Ιούνιος 2009 : Ομιλία στην 15ήμερη επιστημονική συνάντηση του Νοσοκομείου ΥΓΕΙΑ με θέμα : “Ενδοσκοπική υπερηχοτομογραφία : παρόν και μέλλον”

Μάρτιος 2008 : Ομιλία στην 15ήμερη επιστημονική συνάντηση του Νοσοκομείου ΥΓΕΙΑ με θέμα “Ηπατική ινογένεση: Νεώτερα παθοφυσιολογικά δεδομένα. Σύγχρονες διαγνωστικές και θεραπευτικές στρατηγικές”

Μάιος 2007 : Ομιλία στην 15ήμερη επιστημονική συνάντηση του Νοσοκομείου ΥΓΕΙΑ με θέμα “Κοιλιοκάκη : ένας σύγχρονος χαμαιλέων; ”

Μάιος 2005 : 9^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, με θέμα : “ Επίπεδα IL-10 στη θεραπεία ασθενών με ΧΗC και διαφορετικούς γονοτύπους”. Τόμος πρακτικών του συνεδρίου, σ. 43

Μάρτιος 2005: ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», Μηνιαία συνάντηση Γαστρεντερολόγων Αθήνας. Διαφορική διάγνωση περιστατικού

Φεβρουάριος 2005: ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», Μηνιαία συνάντηση Γαστρεντερολόγων Αθήνας. Διαφορική διάγνωση περιστατικού

Δεκέμβριος 2004: 4^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας Πεπτικού , με θέμα : “Ελκώδης Κολίτιδα μετά από κολεκτομή για καρκίνο παχέος εντέρου”, Digestive Oncology, Vol 4, Issue 3, σ. 278

Δεκέμβριος 2004: 4^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας Πεπτικού, με θέμα : “Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα ορθού σε HIV οροθετικό”. Digestive Oncology, Vol 4, Issue 3, σσ 275-276

Απρίλιος 2003: ΠΓΝΑ « Γ. Γεννηματάς », Μηνιαία συνάντηση Γαστρεντερολόγων Αθήνας. Στρογγυλό τραπέζι με θέμα : “Βακτηριδιακές και άλλες κολίτιδες”

Σεπτέμβριος 2001: 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας με θέμα: “Η ενδοσκοπική εικόνα του ανωτέρου πεπτικού σε αιμορραγίες από λήψη μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) ”. Annals of Gastroenterology, Vol 14, Supplement 1, September 2001, σ. 21

Ιανουάριος 2000: 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γηριατρικής - Γεροντολογίας με θέμα : “Αιμορραγίες ανωτέρου πεπτικού στην τρίτη ηλικία”. Τόμος των πρακτικών του συνεδρίου, σ. 76

Αναρτημένες ανακοινώσεις (23)

2006: 57th annual meeting of the American Association of the study of the liver diseases, Boston USA, 28-10-2006: “IL-10 levels during treatment with PegIFN-alpha 2b and ribavirin in patients with Chronic Hepatitis C of different genotyping constitution”

2005 : Η επίπτωση του MH HODGKIN λεμφώματος σε HIV οροθετικούς ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ενδοσκόπηση ανώτερου πεπτικού κατά την προ- και μετα- HAART περίοδο. 17^ο Πανελλήνιο συνέδριο AIDS. σ. 90

2005 : Δυσφαγία σε ασθενείς μετά από γαστρεκτομή και διάχυτος οισοφαγικός σπασμός. PO.006.doc, CD με τα abstracts του συνεδρίου.

2005 : Συσχέτιση μεταξύ ύψους κυμάτων κατώτερου οισοφάγου και πίεσης κατώτερου οισοφαγικού σφιγκτήρα σε ασθενείς με οισοφάγο “nutcracker”. PO.007.doc, CD με τα abstracts του συνεδρίου.

2005 : Η αντιμετώπιση της νοσογόνου παχυσαρκίας με την χρήση του ενδογαστρικού μπαλονιού – Πρόδρομη ανακοίνωση. PO.211.doc, CD με τα abstracts του συνεδρίου.

2005 : Η επίπτωση του σαρκόματος Karosi σε HIV οροθετικούς ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ενδοσκόπηση ανώτερου πεπτικού κατά την προ- και μετα- HAART περίοδο. 17^ο Πανελλήνιο συνέδριο AIDS. σ. 88

2004 : Καθυστέρηση στη διάγνωση των ασθενών με αχαλασία οισοφάγου : 10ετής εμπειρία. 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Annals of Gastroenterology, Vol 17, supplement, November 2004. σ. 20

2004 : Συγκριτική μελέτη της δυσπεψίας μεταξύ Ελλήνων και Αλλοδαπών. 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Annals of Gastroenterology, Vol 17, supplement, November 2004. σ. 26

2004 : Θεραπευτική παρακέντηση ασκίτικού υγρού με ταυτόχρονη ενδοφλέβια χορήγηση αλβουμίνης σε ασθενείς με ανθεκτικό ασκίτη. 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Annals of Gastroenterology, Vol 17, supplement, November 2004. σ. 67

2004 : Η επίπτωση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε ασθενείς οροθετικούς για τον ιό H.I.V. 10^ο Πανελλήνιο συνέδριο Παθολογίας. Νοσοκομειακά χρονικά,. Vol 66, supplement 2004, σ. 113

2004 : Η επίπτωση των οισοφαγιδίων σε ασθενείς οροθετικούς για τον ιό H.I.V. 10^ο Πανελλήνιο συνέδριο Παθολογίας. Νοσοκομειακά χρονικά,. Vol 66, supplement 2004, σ. 114

2004 : Ευρήματα 10ετίας από ενδοσκοπήσεις κατώτερου πεπτικού σε HIV (+) ασθενείς που πραγματοποιήθηκαν στη μονάδα μας. 16^ο Πανελλήνιο συνέδριο AIDS. Βιβλίο πρακτικών του συνεδρίου. σ. 127

2004 : Ευρήματα 10ετίας από ενδοσκοπήσεις ανώτερου πεπτικού σε HIV (+) ασθενείς που πραγματοποιήθηκαν στη μονάδα μας. 16^ο Πανελλήνιο συνέδριο AIDS. Βιβλίο πρακτικών του συνεδρίου. σ. 128

2004 : Η επίπτωση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε HIV οροθετικούς που λαμβάνουν αντιμικροβιακή αγωγή. 16^ο Πανελλήνιο συνέδριο AIDS. Βιβλίο πρακτικών του συνεδρίου. σ. 129

2002 : Σύγκριση μήκους οισοφάγου μεταξύ ασθενών με ιδιοπαθή αχαλασία και ατόμων με φυσιολογική μανομετρία οισοφάγου. 22^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Annals of Gastroenterology, Vol 15, Supplement, November 2002, σ. 24

2002 : Αυξημένη ενδοοισοφαγική πίεση ηρεμίας σε ασθενείς με ιδιοπαθή αχαλασία του οισοφάγου : ένα συχνό και σημαντικό μανομετρικό εύρημα. 22^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Annals of Gastroenterology, Vol 15, Supplement, November 2002, σ. 24

2001 : Υπερασβεστιαμία από έκκριση πρωτεΐνης με δράση παραθορμόνης (PTHrP) σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα με HBV κίρρωση, 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό συνέδριο. Τόμος προγράμματος και περιλήψεων του συνεδρίου, σ. 57

2001 : Η επίπτωση της γήρανσης στους βιοχημικούς δείκτες της χολόστασης. 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό συνέδριο. Τόμος προγράμματος και περιλήψεων του συνεδρίου, σ. 59

2001 : Ποσοτική εκτίμηση της επιβάρυνσης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με αιμορραγία ανώτερου πεπτικού. 21^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Annals of Gastroenterology, Vol 14, Supplement 1, September 2001, σ. 70

2000: Αιτιολογική προσέγγιση των οξείων αιμορραγιών του κατωτέρου πεπτικού. 20^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Volume 13, supplement 2, November 2000, σ. 55

2000 : Η αξιολόγηση της αλκαλικής φωσφατάσης στην κλινική πράξη. 20^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Volume 13, supplement 2, November 2000, σ. 55

1998 : Η λοίμωξη από *Helicobacter Pylori* σε ασθενείς με χειρουργημένο στομάχι. 18^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Hellenic Journal of Gastroenterology, Vol 11, supplement 1998 σ. 44

1998 : Αυτοάνοση χολαγγειοπάθεια. Ξεχωριστή οντότητα στα πλαίσια της αυτοάνοσης ηπατοπάθειας; 18^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Hellenic Journal of Gastroenterology, Vol 11, supplement 1998 σ. 71

Συνέδρια με πρακτική εξάσκηση (8)

Ιανουάριος 2011 : 12^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στη γαστρεντερική κινητικότητα και Αισθητικότητα, Βόλος, ποσοστό επιτυχών απαντήσεων στη γραπτή δοκιμασία εξέτασης 100%

Ιανουάριος 2009 : 10^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στη γαστρεντερική κινητικότητα και Αισθητικότητα, Δελφοί : Οισοφάγος, ποσοστό επιτυχών απαντήσεων στη γραπτή δοκιμασία εξέτασης 70%

Νοέμβριος/Δεκέμβριος 2006 : 8^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στη γαστρεντερική κινητικότητα και Αισθητικότητα, Καμένα Βούρλα : στόμαχος-λεπτό έντερο-χοληφόρα, ποσοστό επιτυχών απαντήσεων στη γραπτή δοκιμασία εξέτασης 75%

Νοέμβριος 2004: 6^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στη Γαστρεντερική κινητικότητα και Αισθητικότητα, Αλεξανδρούπολη : παχύ έντερο - ορθοπρωκτική περιοχή, ποσοστό επιτυχών απαντήσεων στη γραπτή δοκιμασία εξέτασης 75%

Μάιος – Ιούνιος 2004: Πρακτικά βήματα στην Υπερηχογραφία της Άνω και Κάτω κοιλίας, Αθήνα

Νοέμβριος 2003: 5^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στη γαστρεντερική κινητικότητα και Αισθητικότητα, Χανιά : στόμαχος - λεπτό έντερο, ποσοστό επιτυχών απαντήσεων στη γραπτή δοκιμασία εξέτασης 67%

Οκτώβριος 2003: Εκπαιδευτικό Ενδοσκοπικό Σεμινάριο Προσομοίωσης, Θεσσαλονίκη

Ιανουάριος 2003: 1^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο προσομοίωσης Ενδοσκοπικών πράξεων, Αθήνα

Διοργάνωση συνεδρίων (2)

Ιανουάριος 2017 : Πρόεδρος της Επιστημονικής Επιτροπής του «2^ο Πανελλήνιου Συνεδρίου ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ», το οποίο πρόκειται να λάβει χώρα στην Κύμη Ευβοίας τον Σεπτέμβριο του 2018.

Σεπτέμβριος 2012: Πρόεδρος της επιστημονικής επιτροπής του «1^ο Πανελλήνιου Συνεδρίου ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ – Η ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ», που διεξήχθη στην Κύμη Ευβοίας (21-23/9/2012), με αφορμή την επέτειο των 50 ετών από το θάνατο του γιατρού-ερευνητή Γεωργίου Ν. Παπανικολάου.

Διδακτική εμπειρία

2014-2017: Διδασκαλία τομέων του μαθήματος της Ιστολογίας – Εμβρυολογίας II στους δευτεροετείς φοιτητές της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, σε τμήματα τα οποία αφορούν σε όργανα του πεπτικού συστήματος.

2014-2017 : Διδασκαλία μεταπτυχιακών φοιτητών του Διατμηματικού Διαπανεπιστημιακού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Οργάνωση υπηρεσιών Υγείας» και του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Πληροφορική της Υγείας» του τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών σε σύγχρονα δεδομένα που αφορούν στις κακοήθειες νεοπλασίες του πεπτικού συστήματος.

Υποτροφίες και Βραβεία

Ιανουάριος 2011 : 12^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στη γαστρεντερική κινητικότητα και Αισθητικότητα, Βόλος, ποσοστό 100% (βράβευση για την επίτευξη του καλύτερου ποσοστού μεταξύ 70 συμμετεχόντων)

Νοέμβριος 2006: 57th annual meeting of the American Association of the study of the liver diseases, Boston USA, 28-10-2006: “IL-10 levels during treatment with PegIFN-alpha 2b and ribavirin in patients with Chronic Hepatitis C of different genotyping constitution” [βραβεύθηκε μεταξύ των 10 καλύτερων εργασιών του συνεδρίου]

Ιανουάριος 1994 - Μάρτιος 1994 : Πρακτική άσκηση στη Χειρουργική του πέμπτου έτους σπουδών της Ιατρικής Σχολής, ως υπότροφος του προγράμματος ERASMUS, Νοσοκομείο Val d' Aurelle, Montpellier, Γαλλία

ABSTRACT

K-ras oncogene is a key factor in colorectal cancer. Based on published and our data we propose that *K-ras* could be the oncogene responsible for the inactivation of the tumor-suppressor gene *APC*, currently considered as the initial step in colorectal tumorigenesis. *K-ras* fulfills the criteria of the oncogene-induced DNA damage model, as it can provoke well established causes for inactivating tumor-suppressors, *i.e.* DNA double-strand breaks (causing allele deletion) and ROS production (responsible for point mutation). The model we propose is a variation of the current one and hypothesizes that, in a subgroup of colorectal carcinomas; *K-ras* mutation may precede *APC* inactivation, representing the earliest driving force and, probably, an early biomarker of colorectal carcinogenesis. This observation is clinically useful, since it may modify the preventive colorectal cancer strategy, restricting numerically patients undergoing colonoscopies to those bearing *K-ras* mutation in their colorectum, either in benign polyps or the normal accompanying mucosa.

Margetis N, Kouloukoussa M, Pavlou K, Vrakas S and Mariolis-Sapsakos T: *K-ras* Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas. *In Vivo*. 2017 Jul-Aug ; 31(4) : 527-542. PMID: 28652417

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ογκογονίδιο *K-ras* αποτελεί παράγοντα-κλειδί στον ορθοκολικό καρκίνο. Βασισμένοι σε δεδομένα τόσο δημοσιευμένα από άλλους όσο και δικά μας, προτείνουμε ότι το *K-ras* θα μπορούσε να είναι το υπεύθυνο ογκογονίδιο για την απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *APC*, το οποίο, σύμφωνα με την τρέχουσα θέση, θεωρείται ως το αρχικό βήμα στην ορθοκολική ογκογένεση. Το *K-ras* εκπληρώνει τα κριτήρια του μοντέλου της επαγομένης από ογκογονίδιο βλάβης στο DNA (oncogene-induced DNA damage), εφόσον μπορεί να προκαλέσει αποδεδειγμένα θεμελιωμένες γενετικές αιτίες απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, δηλαδή επάγει θραύσεις στη διπλή έλικα του DNA (DNA double-strand breaks), οι οποίες προκαλούν απώλεια αλληλίων και παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων. Το μοντέλο που προτείνουμε είναι μία παραλλαγή του ισχύοντος μοντέλου και υποθέτει ότι, σε μία υποομάδα ορθοκολικών καρκίνων, η *K-ras* μετάλλαξη μπορεί να προηγείται της *APC* μετάλλαξης, αναπαριστώντας την πλέον πρώιμη κινητήρια δύναμη, και, ενδεχομένως, έναν πρώιμο βιοδείκτη της ορθοκολικής καρκινογένεσης. Αυτή η παρατήρηση είναι κλινικά χρήσιμη, καθώς μπορεί να τροποποιήσει τη στρατηγική πρόληψης του ορθοκολικού καρκίνου, περιορίζοντας αριθμητικά τους ασθενείς που υποβάλλονται σε κολονοσκοπήσεις σε αυτούς που φέρουν την *K-ras* μετάλλαξη στο παχύ τους έντερο ή στο ορθό τους, είτε στους καλοήθεις πολύποδες είτε στο φυσιολογικό βλεννογόνο που τους συνοδεύει.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

	A/A	Σελ	Θέμα
Εικόνες	1	23	Σχέση ανάμεσα στη θνητότητα του ορθοκολικού καρκίνου και το HDI
	2	23	Σχέση επίπτωσης και θνητότητας από ορθοκολικό καρκίνο
	3	26	Χρονική διαδοχή των σταδίων ανάπτυξης σε σποραδικό και κληρονομικό ορθοκολικό καρκίνο
	4	27	Τα διαδοχικά στάδια του κλασικού μονοπατιού του ορθοκολικού καρκίνου
	5	31	Τα τρία μοριακά μονοπάτια ορθοκολικής καρκινογένεσης
	6	36	Η δομή του άξονα της φυσιολογικής κολονικής κρύπτης
	7	37	Φυσιολογικά και καρκινικά, αρχέγονα και διαφοροποιημένα, κύτταρα του εντέρου
	8	38	Wnt σήματα και APC στον άξονα της φυσιολογικής και της αδενωμάτωσης κολονικής κρύπτης
	9	40	Η εσοχή των αρχέγονων κυττάρων στο φυσιολογικό και το καρκινικό κόλον
	10	42	Η βιολογία των φυσιολογικών και των δυσπλαστικών κολονικών κρυπτών
	11	43	Η αλληλουχία αδενώματος-καρκινώματος
	12	44	Το αποδεκτό πρότυπο ανάπτυξης του ορθοκολικού καρκίνου
	13	45	Η αλληλουχία του οδοντωτού αδενώματος-καρκινώματος
	14	45	Το μονοπάτι Wnt/APC/β-κατενίνη σε καταστάσεις αδράνειας και ενεργοποίησης
	15	46	Η συμβολή της πρώιμης ενεργοποίησης του Wnt στην εκκίνηση της ορθοκολικής καρκινογένεσης
	16	51	Η αλληλεπίδραση των κύριων μονοπατιών (Wnt και MAPK) του ορθοκολικού καρκίνου
	17	54	Τα σηματοδοτικά δίκτυα της RAS-GTP
	18	55	Πρωτεΐνη RAS : ο σύνδεσμος των εξοκυττάρων μηνυμάτων με τις ενδοκυττάρειες λειτουργίες
	19	71	Πολυμερισμός της φορμαλδεϋδης και αποπολυμερισμός της παραφορμαλδεϋδης
	20	123	Η πρώιμη κυκλική ανατροφοδότηση μεταξύ K-ras και APC στην ορθοκολική ογκογένεση
	21	125	Διάγραμμα ροής και αλληλεπίδρασης της πληροφορίας ανάμεσα στα μονοπάτια Wnt και MAPK
	22	126	Το προτεινόμενο εναλλακτικό πρότυπο ανάπτυξης του σποραδικού ορθοκολικού καρκίνου
Διαγνωστικές Εικόνες	1	83	Έλεγχος των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης
	2	85	Πρότυπη εικόνα αρχείου RFLPs για τη διάγνωση των μεταλλάξεων mt 12 και mt 13
	3	86	Διάγνωση μεταλλαγμένου (mt 12) και φυσιολογικού (wt) K-ras με RFLPs
	4	86	Διάγνωση μεταλλαγμένου (mt 12 και mt 13) και φυσιολογικού (wt) K-ras με RFLPs
Πίνακες	1	69	Πανόραμα των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα
	2	70	Ενδοσκοπικά χαρακτηριστικά και κατανομή ιστικών περιοχών στα ca-free και ca-bearing groups
	3	87	Χαρακτηριστικά των ασθενών του cancer-bearing group
	4	88	Χαρακτηριστικά των μελών του cancer-free group
	5	89	Χαρακτηριστικά των υγιών εθελοντών του control group
	6	91	Ηλικία και K-ras μετάλλαξη
	7	94	Φυσιολογικοί ορθοκολικοί ιστοί της έρευνας και K-ras μετάλλαξη
	8	97	Χαρακτηριστικά των κλασικών αδενωμάτων της έρευνας
	9	99	Καλοήθεις ορθοκολικοί πολύποδες της έρευνας και K-ras μετάλλαξη
	10	100	Σταδιοποίηση των ορθοκολικών καρκίνων της έρευνας και K-ras μετάλλαξη
	11	104	Το cancer-free group αποτελεί ενιαία οντότητα ως προς την K-ras μετάλλαξη
	12	107	Τα ποσοστά της K-ras μετάλλαξης στις ιστικές περιοχές των cancer-bearing και cancer-free groups
	13	108	Τα επίπεδα κλιμακούμενης αύξησης της μετάλλαξης K-ras στο polyp-bearing bowel
Γραφήματα	1	103	Η K-ras μετάλλαξη σε φυσιολογικές και νεοπλασματικές περιοχές του cancer-free group
	2	105	Η K-ras μετάλλαξη σε φυσιολογικές και νεοπλασματικές περιοχές του cancer-bearing group
	3	109	Οι κομβικές αυξήσεις της K-ras μετάλλαξης στο cancer-free group
	4	109	Οι κομβικές αυξήσεις της K-ras μετάλλαξης στο cancer-bearing group
	5	111	Οι κομβικές αυξήσεις της K-ras μετάλλαξης στο polyp-bearing group
Πρωτόκολλα	1	134	Πρωτόκολλο ιντερφερόνης γ
	2	135	Πρωτόκολλο RAS A/B
	3	135	Πρωτόκολλο RAS A/C
	4	136	Πρωτόκολλο RFLPs για ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του K-ras
	5	137	Πρωτόκολλο RFLPs για ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 13 του εξωνίου 2 του K-ras

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Επιδημιολογία καρκίνου παχέος εντέρου και ορθού

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού (ΚΠΕΟ) είναι διαχρονικά μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας σε όλο τον πλανήτη. Κατά τις προηγούμενες δεκαετίες ο επιπολασμός (συνολικά καταγραφόμενα περιστατικά σε δεδομένη χρονική στιγμή) και η επίπτωση (νέα καταγραφόμενα περιστατικά ανά προσωποχρόνο) της νόσου παρουσιάζουν συνεχώς αυξητικές τάσεις. Σύμφωνα με διεθνή στατιστικά (2012), περίπου 1.400.000 άνθρωποι πρωτοδιαγιγνώσκονται το χρόνο παγκοσμίως με ΚΠΕΟ και περίπου 700.000 άνθρωποι χάνουν τη ζωή τους σε όλο τον κόσμο ετησίως από ορθοκολικό καρκίνο¹. Αποτελεί παγκοσμίως την τρίτη πιο συχνή κακοήθεια, τον τρίτο πιο συχνό καρκίνο στους άνδρες (746.000 νέες περιπτώσεις, 10% του συνόλου των νέων καρκίνων) και τον δεύτερο πιο συχνά διαγιγνώσκόμενο καρκίνο στις γυναίκες (614.000 νέες περιπτώσεις ετησίως, 9,2% του συνόλου των νέων καρκίνων)². Είναι η τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, η τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες¹ και η τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο αθροιστικά³. Η πενταετής επιβίωση των πασχόντων από ΚΠΕΟ ανέρχεται στο 65%, ενώ όταν η νόσος εντοπίζεται σε πρώιμο στάδιο (εντοπισμένη νόσος) το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 90%⁴. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την αξία της έγκαιρης διάγνωσης και της πρόληψης της νόσου.

Ο διογκούμενος όγκος των δεδομένων κατά τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ΚΠΕΟ είναι νόσος που σχετίζεται με τη διατροφή⁵⁻⁸ και ότι η επίπτωσή του αυξάνεται παραλλήλως και αναλόγως και με το δείκτη της ανθρώπινης ανάπτυξης^{3,9}. Ο δείκτης ανθρώπινης ανάπτυξης (**human development index-HDI**) μιας χώρας εξαρτάται από το βιοτικό/οικονομικό επίπεδο της χώρας και καθορίζεται από το προσδόκιμο επιβίωσης, το επίπεδο εκπαίδευσης και το κατά κεφαλήν εισόδημα των πολιτών της χώρας αυτής. Μελέτες της δεκαετίας του '90 που είχαν δείξει ότι ο ΚΠΕΟ αποτελούσε υποψήφια επιπλοκή του σακχαρώδους διαβήτη¹⁰ επιβεβαιώθηκαν από πρόσφατες μετα-αναλύσεις, που κατατάσσουν τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την πρόκληση ΚΠΕΟ^{11,12}. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι και οι λοιποί παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕΟ^{5,7} και ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναιμία ίσως αποτελούν τον κρίκο που συνδέει τον δυτικό τρόπο υπερκατανάλωσης με τον ΚΠΕΟ^{18,19}. Τέλος, σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, η ηλικία διάγνωσης του ΚΠΕΟ όλο και μειώνεται, και, παρότι ο μ.ο. της ηλικίας διάγνωσης είναι τα 69 έτη, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ΚΠΕΟ –σύμφωνα με πολύ πρόσφατα στοιχεία – ακόμα και σε ηλικίες μικρότερες των 14 ετών⁴.

Επιπλέον βρέθηκε ότι η κατανομή του φορτίου του ΚΠΕΟ ποικίλλει αξιοσημείωτα ανάμεσα στις διάφορες χώρες και ότι τα 2/3 των περιπτώσεων και το 60% των θανάτων λόγω ΚΠΕΟ καταγράφονται σε χώρες με υψηλό ή πολύ υψηλό HDI (εικόνα 2). Το 2009 η παγκόσμια επίπτωση της νόσου ήταν 9,4 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού^{5,13}. Παρατηρείται πολύ μεγάλη γεωγραφική ποικιλία στην επίπτωση της νόσου. Έτσι το 2008 καταγράφηκε έως και 25πλάσια διαφορά στην επίπτωση της νόσου (Κεντρική Αφρική 2,3/100.000, Ιαπωνία 49,3/100.000)^{3,5}, το 2009 η επίπτωση ήταν 3,8/100.000 σε περιοχές χαμηλού εισοδήματος και 13,4/100.000 σε περιοχές υψηλού εισοδήματος¹³ και το 2012 η εκτιμώμενη επίπτωση της νόσου σε χώρες με πολύ υψηλό HDI υπολογίστηκε έως και 6πλάσια της επίπτωσης της νόσου σε χώρες με χαμηλό HDI⁵. Μάλιστα ο ΚΠΕΟ έχει χαρακτηριστεί ως το πρότυπο του καρκίνου που αυξάνει την επίπτωσή του κατά τη μετάβαση ενός κράτους από το χαμηλό στο μέτριο ή το υψηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο³.

Είναι γνωστό ότι ο ΚΠΕΟ αναπτύσσεται σε άτομα με γενετική προδιάθεση, σε απάντηση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αυτοί οι περιβαλλοντικοί, δυνητικά τροποποιήσιμοι,

παράγοντες κινδύνου συνεισφέρουν σημαντικά και εν δυνάμει είναι υπαίτιοι για τις πολύ μεγάλες διαφορές στην επίπτωση της νόσου. Πράγματι έχει αποδεχθεί ότι οι αλλαγές στον τρόπο ζωής που απορρέουν από την πολιτιστική άνοδο, την οικονομική ανάπτυξη, την ευδοκίμηση του εμπορίου και την κοινωνική πρόοδο έχουν συσχετισθεί με την αύξηση της επίπτωσης διαφόρων νόσων, μεταξύ των οποίων η ισχαιμική στεφανιαία νόσος και ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού. Αυτές οι αλλαγές εν συντομία περιλαμβάνουν τη μείωση της φυσικής δραστηριότητας, το κάπνισμα, το αλκοόλ, την παχυσαρκία, την κατανάλωση κόκκινου κρέατος, επεξεργασμένων τροφών και ζωικού λίπους και τη μειωμένη πρόσληψη φρούτων, λαχανικών, φυτικών ινών, αντιοξειδωτικών βιταμινών και ψαριών. Απεδείχθη επίσης ότι μετανάστες δεύτερης γενιάς σε χώρες με αυξημένο βιοτικό επίπεδο έχουν διπλάσια επίπτωση ΚΠΕΟ σε σχέση με αυτούς της πρώτης γενιάς⁵. Η επιδημιολογική συσχέτιση μεταξύ των διατροφικών συνηθειών και του ΚΠΕΟ τεκμηριώθηκε από μελέτες σε αναπτυσσόμενες χώρες. Το τελικό συμπέρασμα των μελετών αυτών ήταν ότι η αστικοποίηση και η δυτικοποίηση του τρόπου ζωής οδήγησε σε δραματική αύξηση της επίπτωσης του ΚΠΕΟ^{14,15}. Επιπλέον, έχει αποσαφηνισθεί ότι περίπου οι μισοί ΚΠΕΟ θα μπορούσαν να προληφθούν μόνο με την τροποποίηση των επίκτητων παραγόντων κινδύνου (lifestyle)⁵. Λόγω της επιδημιολογικής συσχέτισης των παραμέτρων ανάπτυξης και ευμάρειας με τον ΚΠΕΟ, είναι λογικό να χαρακτηρίσουμε τον ΚΠΕΟ ως νόσο του πολιτισμού⁵.

Ο δείκτης θνησιμότητας ανά περίπτωση του ΚΠΕΟ (case-fatality rate, το πηλίκο του δείκτη θνητότητας προς την επίπτωση για μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο), αν και σφαιρικά κυμαίνεται περίξ του 50% (50,4%), δείχνει επίσης εικόνα μωσαϊκού μεταξύ χωρών με διαφορετικό HDI: σε χώρες με χαμηλό HDI είναι 70,5% ενώ σε χώρες με πολύ υψηλό HDI είναι 41,4% (εικόνα 1)¹³.

Η τάση που υπάρχει σήμερα τόσο για την επίπτωση όσο και για τη θνητότητα του ΚΠΕΟ είναι παγκοσμίως ανησυχητικά αυξητική. Ήδη οι εκτιμήσεις του 2009 (Economist Intelligence Chart) προέβλεπαν αύξηση της επίπτωσης κατά 25,8 % έως το 2020, εκτιμήσεις που έκτοτε επιβεβαιώνονται χρόνο με το χρόνο¹³. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας εκτιμά ότι μέχρι το 2030 τόσο η επίπτωση όσο και η θνητότητα θα έχουν παρουσιάσει αύξηση της τάξης του 60% (2,2 εκατομμύρια οι εκτιμώμενες νέες περιπτώσεις ετησίως και 1,1 εκατομμύρια οι εκτιμώμενοι νέοι θάνατοι ετησίως). Η εκτίμηση αυτή παρουσιάζει, εν τούτοις, έντονη ποικιλομορφία: σε χώρες με πολύ υψηλό HDI η - ήδη αυξημένη - επίπτωση του ΚΠΕΟ τείνει να αυξηθεί, ενώ η θνητότητα τείνει να μειωθεί, σε χώρες με υψηλό HDI αμφότεροι οι δείκτες επίπτωσης και θνητότητας τείνουν να μειωθούν ενώ σε χώρες με ταχεία άνοδο του βιοτικού επιπέδου (μεσαίο και χαμηλό HDI), τείνουν να αυξηθούν τόσο η επίπτωση όσο και η θνητότητα συνεπεία του ΚΠΕΟ³.

Η μείωση της επίπτωσης στη δεύτερη ομάδα χωρών αποδίδεται στις αλλαγές των διατροφικών συνηθειών επί τα βελτίω και στην στρατηγική προληπτικού ελέγχου. Γενικά, η εισαγωγή μιας καινούργιας προληπτικής εξέτασης (ολική κολονοσκόπηση) για μαζικό έλεγχο του πληθυσμού για τον ΚΠΕΟ μπορεί να οδηγήσει αρχικά σε αύξηση της επίπτωσης της νόσου, λόγω της ανακάλυψης αδιάγνωστων περιπτώσεων, στην πορεία όμως μειώνει την επίπτωση της νόσου, λόγω της αφαίρεσης των προκαρκινικών καλοήθων πολυπόδων³. Η χαρακτηριστικότερη χώρα που ανεδείχθη κατά τις πρόσφατες δεκαετίες ότι ο προληπτικός έλεγχος (προληπτική κολονοσκόπηση) μειώνει σημαντικά τόσο την επίπτωση όσο και τη θνητότητα του ορθοκολικού καρκίνου είναι οι Η.Π.Α.^{1,2,3,16}.

Η μείωση της θνησιμότητας στις δύο πρώτες ομάδες χωρών, οφείλεται στην οικονομική ευμάρεια των κρατών αυτών που εξασφαλίζει τη συμμετοχή σε εξετάσεις προληπτικού ελέγχου και τη διάθεση κονδυλίων για την έρευνα, στην πρωιμότερη διάγνωση της νόσου

λόγω του προληπτικού ελέγχου και στις βελτιωμένες πρακτικές αντιμετώπισης και θεραπείας του ΚΠΕΟ που είναι διαθέσιμες και ευκόλως προσβάσιμες στις χώρες αυτές³.

Αντιθέτως, στην τρίτη ομάδα χωρών (χαμηλό-μεσαίο HDI με ταχεία αύξηση του εισοδήματος και του βιοτικού επιπέδου) η ήδη αυξημένη επίπτωση του ΚΠΕΟ, αλλά και η συνεχιζόμενη αύξηση της επίπτωσής του οφείλεται στη δυτικοποίηση του τρόπου ζωής, όπως στην αλλαγή των διατροφικών συνηθειών (εύκολη πρόσβαση σε υψηλής θερμιδικής αξίας φθινό φαγητό-fast food, αύξηση κατανάλωσης ζωικού λίπους, ζάχαρης, κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος και αλκοόλ, μείωση κατανάλωσης φρούτων, λαχανικών, ψαριών, περιορισμός φυσικής δραστηριότητας, παχυσαρκία) και στην αύξηση του πληθυσμού των ενεργών και παθητικών καπνιστών. Επιπλέον στις χώρες αυτές η ταυτόχρονη καθυστέρηση της διάγνωσης, της παραπομπής στον ειδικό και της θεραπείας, οι κατά τόπους πολιτισμικές πεποιθήσεις, η μη διαθεσιμότητα ιατροτεχνολογικού εξοπλισμού, νεώτερων φαρμακευτικών θεραπειών του καρκίνου και εξειδικευμένου ιατρικού προσωπικού καθώς και πολλαπλοί οικονομικοί περιορισμοί οδηγούν σε αυξημένη θνησιμότητα από ΚΠΕΟ, αύξηση που αναμένεται να συνεχισθεί³.

Εν κατακλείδι, οι χώρες με χαμηλό βιοτικό επίπεδο έχουν χαμηλότερη επίπτωση ορθοκολικού καρκίνου, συγκρινόμενες με τις χώρες με υψηλό HDI · όσοι όμως προσβληθούν από τη νόσο έχουν σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν από αυτήν (εικόνες 1 και 2). Στο εγγύς μέλλον, στις χώρες με χαμηλό HDI, αναμένεται να νοσούν όλο και περισσότεροι από ΚΠΕΟ, οι οποίοι και θα έχουν όλο και μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν από τη νόσο τους.

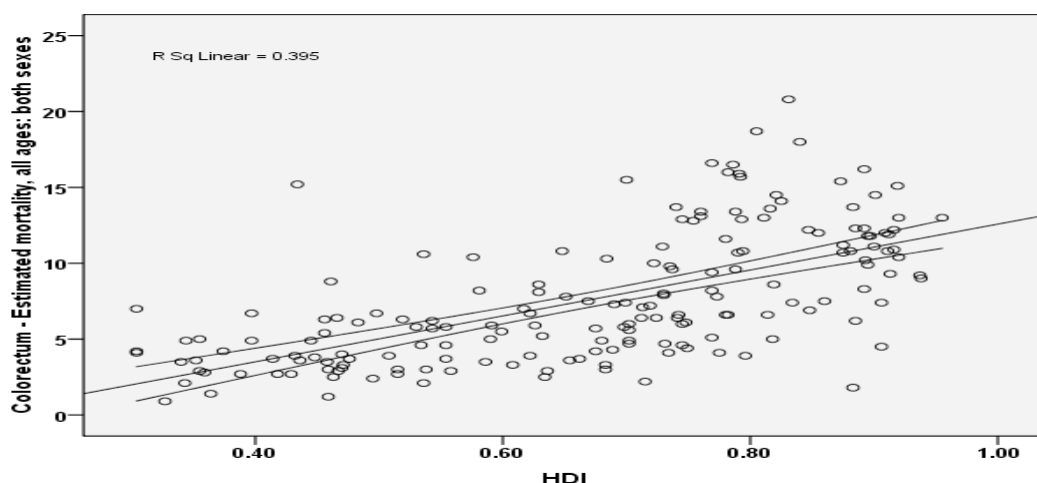
Πέραν τούτων, το συνολικό κόστος για την αντιμετώπιση των νοσούντων από ΚΠΕΟ είναι διαρκώς διογκούμενο και σύντομα αναμένεται να καταστεί δυσβάστακτο για τα συστήματα υγείας ανά την υφήλιο. Η παγκόσμια δαπάνη για τους νοσούντες από ΚΠΕΟ το 2009 υπολογίστηκε ότι ξεπέρασε τα 33 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ¹³. Τόσο ο αριθμός των πασχόντων από ΚΠΕΟ όσο και ο αριθμός των θανάτων που θα αποδίδονται στη νόσο θα αυξάνονται όλο και περισσότερο στο εγγύς μέλλον, ενδεχομένως και σε κλίμακες περισσότερο δυσμενέστερες των τωρινών προβλέψεων, ως αποτέλεσμα της γήρανσης του πληθυσμού, της αύξησης των γεννήσεων και του προσανατολισμού ενός πλανήτη, που βρίσκεται σε οικονομική και επισιτιστική κρίση, στον βολικότερο δυτικό τρόπο ζωής³.

Τα προαναφερθέντα δεδομένα δείχνουν ότι ο ΚΠΕΟ αποτελεί πολύ σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Η αναζήτηση μελλοντικών στρατηγικών που θα στοχεύουν στη μείωση της επίπτωσης της νόσου πρέπει να εστιαστεί στην πρωτογενή πρόληψη και στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου, ειδικά σε χώρες με χαμηλό-μεσαίο HDI όπου οι οικονομικοί πόροι είναι πενιχροί. Με δεδομένο επίσης το γεγονός ότι η διαδικασία καρκινογένεσης στο παχύ έντερο είναι πολυσταδιακή και περνά στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων από το στάδιο του καλοήθους πολύποδα, όπως θα δειχθεί αναλυτικά πιο κάτω, η έρευνα οφείλει να επικεντρωθεί σε αναζήτηση βιολογικών μορίων (βιοδεικτών) οι οποίοι θα ανιχνεύουν έγκαιρα μία προκαρκινική βλάβη ή θα ταυτοποιούν το κόλον, το οποίο θα έχει αυξημένη πιθανότητα να νοσήσει από καρκίνο στο μέλλον. Με τον τρόπο αυτό θα εξασφαλίζεται η συνετή χρήση των εξετάσεων προληπτικού ελέγχου σε όσους τις χρειάζονται. Αναμφίβολα, το μέγεθος των οικονομικών πόρων πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη. Έτσι οι δείκτες αυτοί πρέπει να είναι ευρέως διαθέσιμοι και να απευθύνονται ακόμα και στα οικονομικά ασθενέστερα στρώματα των διαφόρων χωρών, τόσο αυτών με χαμηλό HDI όσο και εκείνων με υψηλό HDI.

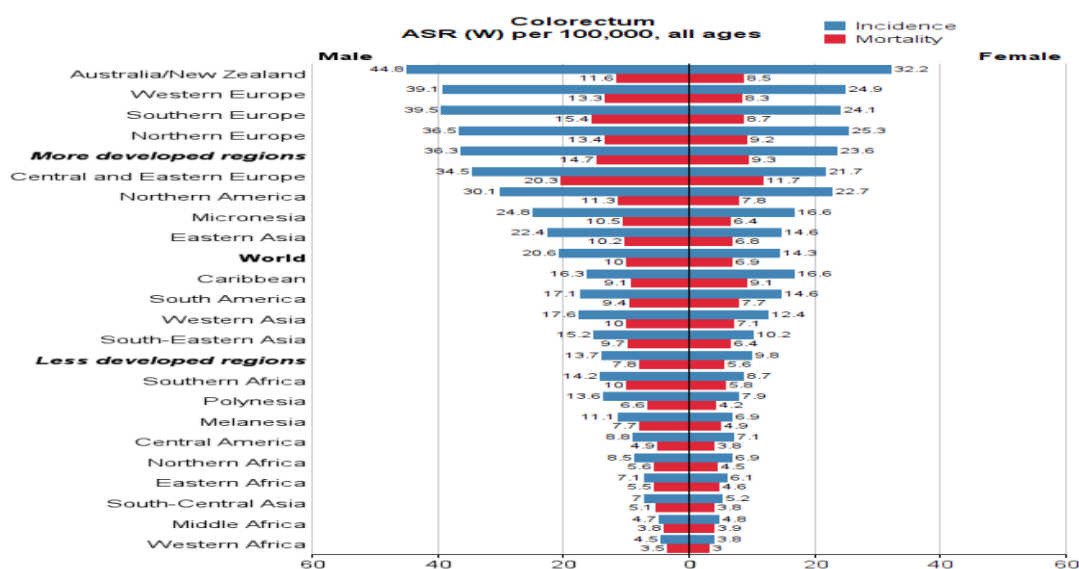
Στηριζόμενοι στα στατιστικά στοιχεία της ECO (2012) για τον ΚΠΕΟ στην Ελλάδα, η επίπτωση ήταν 20,7 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού, η θνητότητα ήταν 12,1 ανά 100.000 πληθυσμού και ο επιπολασμός της νόσου σε ένα χρόνο ήταν 29,7 περιστατικά ανά

100.000 πληθυσμού¹⁷. Παρά το γεγονός ότι οι προαναφερθείσες τιμές κατατάσσουν την Ελλάδα στις τελευταίες θέσεις μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών, όσον αφορά το φορτίο του ΚΠΕΟ, η επίπτωση του ΚΠΕΟ αναμένεται να αυξηθεί στα επόμενα χρόνια, επειδή η Ελλάδα ανήκει, βάσει της ταξινόμησης των Ηνωμένων Εθνών (2015), στις χώρες με το πολύ υψηλό HDI¹⁸. Ήδη από το 2009 υπήρχε η πρόβλεψη για τη χώρα μας, ότι το 2020 οι νέες περιπτώσεις ΚΠΕΟ θα αυξάνοντο κατά 12,9% (τα νέα περιστατικά εκτιμώντο ότι θα ανέβουν από 4104 το 2009 σε 4635 το 2020)¹³.

Συνυπολογίζοντας το ιδιαίτερα αυξημένο κόστος που δαπανήθηκε στη χώρα μας το 2009 συνολικά για τους πάσχοντες από ΚΠΕΟ (περίπου 80 εκατομμύρια δολάρια Η.Π.Α.)¹³, την αναμενόμενη αύξηση της επίπτωσης της νόσου και τα τρέχοντα δυσμενή οικονομικά δεδομένα, τα οποία καθιστούν το κόστος που απαιτείται για να μειωθεί η θνητότητα από ΚΠΕΟ απαγορευτικό, η αναγκαιότητα της εξεύρεσης οικονομικών λύσεων μέσω των οποίων θα είναι εφικτή η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση της νόσου (ανάπτυξη βιοδεικτών που θα είναι προσεγγίσιμοι οικονομικά από τη μεγάλη μάζα του πληθυσμού, ορθή χρήση της κολονοσκόπηση για έγκαιρη διάγνωση και αφαίρεση των καλοήθων πολυπόδων) είναι παραπάνω από επιτακτική.



Εικόνα 1: Σχέση ανάμεσα στη θνητότητα του ΚΠΕΟ και το HDI το 2012 (από αναφορά 9).



Εικόνα 2 : Σχέση επίπτωσης και θνητότητας από ΚΠΕΟ στις ανεπτυγμένες και στις αναπτυσσόμενες χώρες (από αναφορά 19).

2. Μοριακά μονοπάτια στην ορθοκολική καρκινογένεση

Στη διαδικασία καρκινογένεσης εμπλέκονται αρκετά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Κατά την τελευταία δεκαετία έχει αποδειχθεί επιπλέον ο ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος της επιγενετικής τροποποίησης του γονιδιώματος (δηλαδή των αντιστρεπτών επίκτητων αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων που δεν συνοδεύονται από αλλαγές στην αλληλουχία του DNA αλλά κληρονομούνται από κάθε κυτταρική γενιά στην επόμενη με τη μίτωση ²⁰) στην παθογένεση πολλαπλών τύπων κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του ορθοκολικού καρκίνου ^{20,21}. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα επιγενετικής τροποποίησης του γονιδιώματος των όγκων (συμπεριλαμβανομένου του ορθοκολικού καρκίνου ^{22,23}) αποτελεί η αντιστρεπτή αποσιώπηση μερικών γονιδίων από μη κωδικοποιούντα μόρια RNA (microRNAs). Τα microRNAs (αποτελούν μικρού μήκους -18 έως 25- αλληλουχία ριβονουκλεοτιδίων) δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, αλλά αποτρέπουν την έκφραση του mRNA άλλων γονιδίων. Ο πολύ σημαντικός τους ρόλος αποδεικνύεται από τη συνεισφορά τους στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων, μεταξύ αυτών και των ογκογονιδίων που συμβάλλουν στη διαδοχή των σταδίων της καρκινογένεσης ²⁴.

Οι γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται στην ορθοκολική καρκινογένεση συνήθως δεν αποκτώνται στη βλαστική σειρά, δηλαδή στη μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν κληρονομούνται. Πράγματι, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού στο 70% των περιπτώσεων είναι σποραδικός. Στο υπόλοιπο 30% αναφέρεται διάγνωση ΚΠΕΟ σε συγγενή. Από αυτές, το 5% σχετίζονται με μεταλλάξεις με υψηλή διεισδυτικότητα και ανήκουν στα καλώς χαρακτηρισμένα κληρονομικά σύνδρομα του καρκίνου του παχέος εντέρου, στα οποία η μεταφορά από γενιά σε γενιά ενός αυτοσωματικού μεταλλαγμένου γονιδίου αρκεί για την εκδήλωση του συνδρόμου. Το 25%, που απομένει, αφορά σε περιπτώσεις οικογενούς ορθοκολικού καρκίνου, οι οποίες είναι πιθανόν να οφείλονται σε τροποποιήσεις σε λιγότερο διεισδυτικά, αλλά πολύ κοινά γονίδια, η παρουσία του καθενός από τα οποία αυξάνει μεν οριακά μόνο τον κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας, η αλληλεπίδρασή τους όμως σε συνδυασμό με επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες ξεκινά και οδηγεί τη διαδικασία καρκινογένεσης ²⁵. Τέλος, ο σποραδικός ορθοκολικός καρκίνος είναι το αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης σπάνιων γενετικών παραγόντων (άγνωστων κληρονομούμενων ή, συνηθέστερα, αποκτώμενων μεταλλαγμένων γονιδιακών τόπων) επί εδάφους πολλαπλών περιβαλλοντικών και επιγενετικών επιρροών ^{20,25,26} (εικόνα 3).

Κατά το πρόσφατο παρελθόν, ο ΚΠΕΟ έχει αποτελέσει το πρότυπο, σύμφωνα με το οποίο εξελίσσονται οι διάφορες γενετικές τροποποιήσεις κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Στον ΚΠΕΟ πρωτοαποδείχθηκε, σύμφωνα με την πρωτοποριακή εργασία των Fearon και Vogelstein (1990), ότι ο κακοήθης όγκος σε ένα συγκεκριμένο όργανο είναι το αποτέλεσμα της σταδιακής μεταμόρφωσης των φυσιολογικών κυττάρων του οργάνου αυτού σε καρκινικά. Οι ερευνητές αυτοί έδειξαν ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μετεξέλιξη των καλοήθων αδενωμάτων του παχέος εντέρου (καλοήθεις πολύποδες), τα δε αδενώματα προκύπτουν με τη σειρά τους από τη διαταραχή της έκφρασης του πολλαπλασιασμού των κολονικών κυττάρων στις κρύπτες του παχέος εντέρου ²⁷. Τόσο οι συγκεκριμένοι ερευνητές, όσο και οι επίγονοί τους, απέδειξαν ότι η διαδικασία ογκογένεσης στο κόλον συνίσταται σε ένα συνεχές, το οποίο έχει μεν διακριτά ενδιάμεσα στάδια (**φυσιολογικός βλεννογόνος, ανώμαλη δυσπλαστική κρύπτη, πρώιμο αδένωμα, ενδιάμεσο αδένωμα, όψιμο αδένωμα, καρκίνωμα, μεταστατική νόσος**), αλλά η μετάπτωση από το ένα στάδιο στο άλλο είναι συνεχής και προοδευτική. Απέδειξαν επίσης ότι η αιτία της μετάπτωσης από το ένα στάδιο στο επόμενο του είναι οι γενετικές τροποποιήσεις

που συμβαίνουν στο γονιδίωμα των κυττάρων, είτε αυτές αφορούν σε γονίδια (ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια) είτε αφορούν σε χρωμοσωμικές αλλαγές^{20,25-27, 29-33}.

Η συχνότατα προτεινόμενη (από πληθώρα ερευνητών) σειρά διαδοχής των γενετικών αλλαγών, των υπεύθυνων για τη μετεξέλιξη του κάθε σταδίου στο επόμενο του φαίνεται ότι είναι ενδεικτική. Αντιθέτως, αυτό που έχει αιτιοπαθογενετική σημασία για την εκκίνηση, την ώθηση και την ολοκλήρωση της διαδικασίας καρκινογένεσης είναι η **συσσώρευση** των γενετικών αλλαγών. Δηλαδή η πορεία της καρκινογένεσης εξαρτάται από το ποιες μεταλλάξεις έχουν συσσωρευτεί παρά από αυτή καθαυτή τη σειρά με την οποία έχουν αποκτηθεί οι μεταλλάξεις αυτές. Εξάλλου είναι καλώς τεκμηριωμένο ότι η σειρά της διαδοχής των γενετικών αλλαγών στην πολυσταδιακή διαδικασία της ογκογένεσης στον ΚΠΕΟ δεν είναι απόλυτα αυτοαναπαραγόμενη σε κάθε ξεχωριστή περίπτωση ΚΠΕΟ^{27,34,36}.

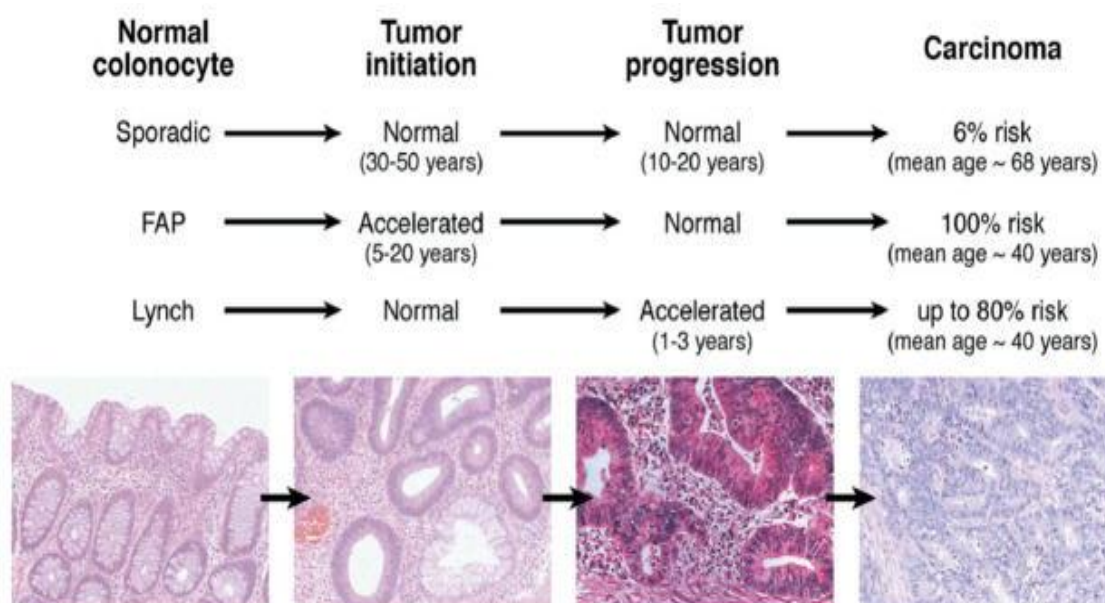
Στη διαδικασία καρκινογένεσης στον ορθοκολικό καρκίνο ανιχνεύεται μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων. Μάλιστα, στις περιοχές του γονιδιώματος που μεταφράζονται, η συχνότητα των σωματικών μεταλλάξεων είναι υπερδεκαπλάσια της συχνότητας των χρωμοσωμικών αλλαγών³⁴. Σε όλες τις μορφές του ορθοκολικού καρκίνου ο ρόλος των σωματικών μεταλλάξεων αποδεικνύεται απόλυτα κρίσιμος και αναγκαίος για την έναρξη και την πρόοδο της ογκογένεσης. Έτσι, σε κάθε πάσχοντα από καρκίνο παχέος εντέρου όπου απουσιάζει η μικροδορυφορική αστάθεια (μικροδορυφορικά σταθεροί καρκίνοι) ανιχνεύονται περίπου 50-100 μη συνώνυμες μεταλλάξεις, ενώ όταν αυτή ανιχνεύεται (μικροδορυφορικά ασταθείς καρκίνοι) ο αριθμός αυτός εκτοξεύεται σε 500-1300. Στον ΚΠΕΟ, οι σωματικές μεταλλάξεις αφορούν κυρίως στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (πχ *APC*, *TP53*), οι οποίες υπερτερούν των σημειακών μεταλλάξεων των ογκογονιδίων (πχ *K-ras*) σε αναλογία περίπου 4 προς 1^{21,35}.

Πρόσφατες μελέτες αλληλούχισης έδειξαν ότι 25 διαφορετικά γονίδια τροποποιούνται κατά μέσον όρο από σωματικές μεταλλάξεις στην πορεία κάθε ορθοκολικής καρκινογένεσης^{21,35}, ενώ σε μελέτες με genome-wide sequencing αποδείχθηκε ότι έως και 100 μεταλλαγμένα γονίδια ανιχνεύονται σε κάποιους ορθοκολικούς καρκίνους³⁷. Η πλειονότητα των σωματικών μεταλλάξεων που ανιχνεύονται, εν τούτοις, στον ορθοκολικό καρκίνο δεν έχουν κάποια επίδραση στη διαδικασία ογκογένεσης, και εντοπίζονται στην μη-κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδιώματος (**passenger mutations**), οι πιο πολλές δε εξ αυτών συμβαίνουν κυρίως στην προνεοπλασματική φάση, κατά την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων. Λιγότερες συγκριτικά μεταλλάξεις προσφέρουν εκλεκτικό πλεονέκτημα επιβίωσης στο κύτταρο : αυτές διακρίνονται σε **gatekeepers** (προσφέρουν εκλεκτικό πλεονέκτημα αύξησης και επιβίωσης στο φυσιολογικό επιθηλιακό κύτταρο και θεωρείται ότι ξεκινούν τη διαδικασία ογκογένεσης) και σε **οδηγές μεταλλάξεις (driver gene mutations)**, οι οποίες προσφέρουν -άμεσα ή έμμεσα- πλεονέκτημα επιβίωσης στα κύτταρα στα οποία έχει ήδη ξεκινήσει η διαδικασία ογκογένεσης. Οι οδηγές μεταλλάξεις περιέχουν είτε **mut-driver genes**, γονίδια δηλαδή που είναι μεταλλαγμένα είτε **epi-driver genes**, γονίδια δηλαδή που δεν έχουν μεταλλαχθεί, αλλά εκφράζονται ανώμαλα³⁴. Στην πορεία αποδείχθηκε ότι αρκούν 3 γονιδιακές τροποποιήσεις με δυνατότητα να προσφέρουν εκλεκτικό πλεονέκτημα επιβίωσης για την μεταμόρφωση του φυσιολογικού βλεννογόνου του παχέος εντέρου ή του ορθού σε καρκινικό³⁸.

Η αστάθεια του γονιδιώματος έχει αναγνωρισθεί από όλους τους ερευνητές ως απολύτως αναγκαία για την ανάπτυξη της μεγάλης πλειοψηφίας των ανθρώπινων καρκίνων. Έτσι έχει αποδειχθεί ότι ελλείμματα στην επιδιόρθωση και τη διατήρηση του γονιδιώματος αποδεικνύονται ότι προσφέρουν εκλεκτικό πλεονέκτημα στην πρόοδο και την ανάπτυξη του όγκου, ακριβώς διότι επιταχύνουν το ρυθμό με τον οποίο τα αναπτυσσόμενα προκαρκινικά κύτταρα αθροίζουν γονότυπους ευνοϊκούς για την περαιτέρω μεταμόρφωσή τους σε καρκινικά. Η γενωμική αστάθεια θεωρείται απολύτως απαραίτητη για την απόκτηση από τα

καρκινικά κύτταρα όλων των ιδιαίτερων τυπικών χαρακτηριστικών του καρκίνου (hallmarks of cancer) στην πορεία της καρκινογένεσης²⁹.

Η γενωμική αστάθεια (genomic instability) θεωρείται παράγοντας-κλειδί και απαραίτητο βασικό χαρακτηριστικό για την ανάπτυξη και του ορθοκολικού καρκίνου²⁰. Είναι απόλυτα αναγκαία για την επιτάχυνση της ογκογόνου διαδικασίας, διότι διευκολύνει την απόκτηση από το μεταμορφούμενο αρχικό προγονικό κύτταρο της κολονικής κρύπτης της κάθε ξεχωριστής ιδιότητας-σφραγίδας του καρκίνου²⁹ και ευνοεί τη μετατροπή του σε πρόδρομο κύτταρο με μεταλλαγμένο φαινότυπο⁴⁰. Έχουν αναγνωρισθεί τρεις διαφορετικοί τύποι ή μορφές γενωμικής αστάθειας, που χαρακτηρίζουν αντίστοιχα τα τρία κύρια μοριακά μονοπάτια μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η καρκινογένεση στο κόλον^{36,39}: το μονοπάτι της χρωσωμικής αστάθειας (CIN)³⁹, το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI ή MIN) και το μονοπάτι του φαινοτύπου της υπερμεθυλίωσης των νησιδίων CpG (CIMP)³⁶. Το τελευταίο μονοπάτι αφορά στην επιγενετική τροποποίηση του γονιδιώματος, που απορρέει από την μεθυλίωση του DNA των φυσιολογικών ή των νεοπλασματικών κυττάρων³⁰. Κάθε μονοπάτι βασίζεται στις αρχές του πολυσταδιακού μοντέλου των Vogelstein/Fearon, περιλαμβάνει διακριτά αλληλοδιάδοχα γενετικά στάδια, διαδοχικές δηλαδή γενετικές τροποποιήσεις, που οδηγούν τον φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου να αλλάξει σταδιακά την ιστική του δομή και έκφραση, να διέλθει υποχρεωτικά από ενδιάμεσες καλοήθεις βλάβες (κυρίως από πολύποδες, που αποτελούν ταυτόχρονα και προκαρκινικά στάδια) καταλήγοντας σε ορισμένες περιπτώσεις στην ανάπτυξη καρκίνου, επί εδάφους του προϋπάρχοντος καλοήθους πολύποδα. Οι πέντε διαφορετικοί γονότυποι καρκίνου παχέος εντέρου (πέντε διαφορετικά μοντέλα καρκινογένεσης) που θα αναφερθούν στο κεφάλαιο 3 προκύπτουν από ένα από τα τρία βασικά μονοπάτια, από συνδυασμό τους ή από κάποια παραλλαγή τους^{28,41-43}.

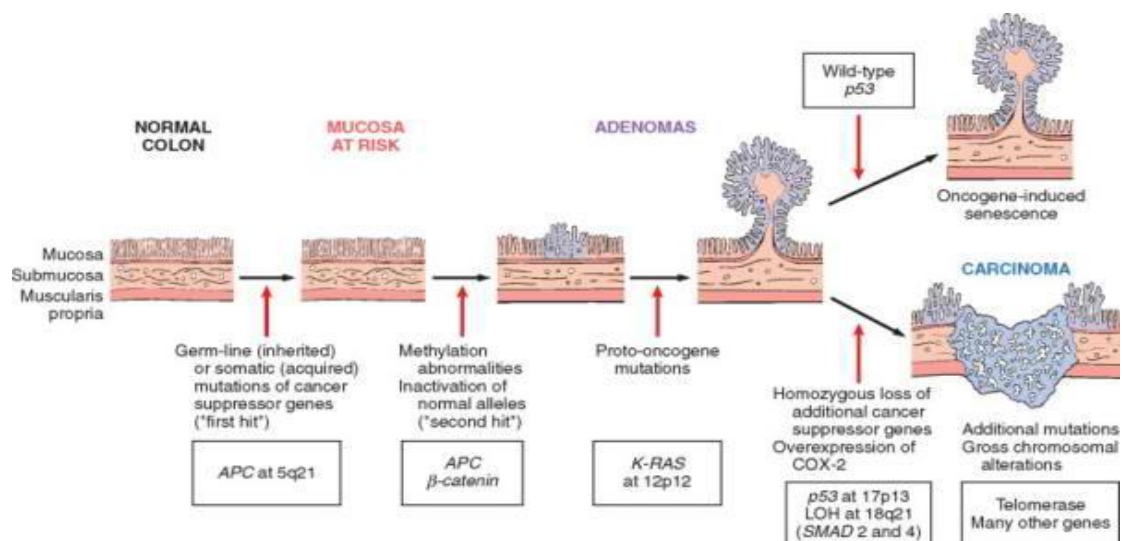


Εικόνα 3 : Απεικόνιση της προόδου του νεοπλάσματος στο παχύ έντερο και το ορθό τόσο στο σποραδικό ορθοκολικό καρκίνο όσο και στα συχνότερα γενετικά σύνδρομα που προδιαθέτουν σε ορθοκολικό καρκίνο (από αναφορά 31).

1^ο μονοπάτι : Το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (Chromosomal instability - CIN- pathway).

Είναι το κλασικό μονοπάτι, όπου η χρωμοσωμική αστάθεια είναι το τυπικό χαρακτηριστικό. Η CIN αναφέρεται στον αυξημένο ρυθμό της απώλειας ή της προσθήκης μέρους ή της ολότητας των χρωμοσωμάτων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της προόδου του νεοπλάσματος⁴⁴. Χαρακτηρίζεται από ανισορροπία στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (ανεupλοειδία) και από απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH), η οποία είναι το βασικό της χαρακτηριστικό. Μπορεί να προέλθει από διαταραχές του αποχωρισμού των χρωμοσωμάτων, από τη διαταραχή στη σταθερότητα της πολυμεράσης και από απάντηση του κυττάρου στη βλάβη του DNA. Συνδυάζεται με καρυοτυπικές ανωμαλίες²⁵. Το μονοπάτι αυτό προτάθηκε αρχικά από τον Vogelstein²⁷ και απαντάται στο 80% περίπου των σποραδικών ΚΠΕΟ^{20,28,30}.

Το αρχικό γεγονός του μονοπατιού (πρώτο χτύπημα, first hit) είναι η μετάλλαξη του ενός αλληλίου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *APC* (adenomatous polyposis coli), γεγονός που θέτει το βλεννογόνο του παχέος εντέρου σε κίνδυνο²⁸. Ακολούθως το δεύτερο αλληλίο *APC* μεταλλάσσεται, χάνεται ή αποσιωπάται επιγενετικά (δεύτερο χτύπημα, second hit). Το *APC* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση (ανάφαση) και η ολοσχερής απώλεια της λειτουργικότητάς του στα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) των κολονικών κρυπτών δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για ανάπτυξη περαιτέρω σωματικών μεταλλάξεων, όπως αυτή του πρωτοογκογονιδίου *K-ras*, η οποία και επιταχύνει την καρκινογένεση (εικόνα 4)⁴⁵. Έχει βρεθεί ότι οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *K-ras* είναι ιδιαίτερα συχνές στο μονοπάτι αυτό και ότι διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην εξέλιξη της καρκινογένεσης²⁸.



Εικόνα 4 : Τα διαδοχικά στάδια του κλασικού μονοπατιού ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού (μονοπάτι χρωμοσωμικής αστάθειας) με τις σημαντικότερες μεταλλάξεις. Φαίνεται η αρχική μετάλλαξη σε ένα από τα αλληλίου του *APC*, η οποία θέτει τον ορθοκολικό βλεννογόνο σε κίνδυνο (από αναφορά 40, σελίδα 321).

Η χρωμοσωμική αστάθεια αναπτύσσεται σταδιακά στην πορεία της καρκινογένεσης (εικόνα 11, σελίδα 43). Παραμένει εν τούτοις αδιευκρίνιστη η αιτιολογική της σχέση με τις μεταλλάξεις που συναντώνται στο μονοπάτι αυτό, είναι άγνωστο δηλαδή εάν οι μεταλλάξεις προκαλούν την χρωμοσωμική αστάθεια ή εάν η χρωμοσωμική αστάθεια δημιουργεί το κατάλληλο κυτταρικό περιβάλλον για την δημιουργία μεταλλάξεων ή την ανεπάρκεια του

μηχανισμού επιδιόρθωσης²⁵. Οι περισσότεροι ερευνητές πιστεύουν ότι αμφότερες οι συνθήκες συμβαίνουν^{20,44}. Επίσης παραμένει αδιευκρίνιστο εάν η χρωμοσωμική αστάθεια είναι η αιτία ή η συνέπεια της ογκογενετικής διαδικασίας²⁵. Συνήθως οδηγεί σε παραδοσιακά αδενώματα και καρκινώματα, σπανιότερα δε σε οδοντωτά αδενώματα/καρκινώματα.

Η μετάλλαξη του αρχικού αλληλίου APC είναι βλαστική στην οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (FAP) και σωματική στο σποραδικό ΚΠΕΟ³⁶. Η διαφορά μεταξύ του σποραδικού ΚΠΕΟ και της FAP είναι ότι στη FAP το αρχικό στάδιο, αυτό της ανάπτυξης των αδενωμάτων, είναι ταχύ (rate-increasing step, 5-20 έτη), επειδή το πρώτο χτύπημα κληρονομείται. Επί του βλεννογόνου, που βρίσκεται ήδη εκ γενετής σε κίνδυνο, επιδρά γρήγορα το δεύτερο χτύπημα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλαπλά αδενώματα, επί των οποίων επιδρούν σημειακές μεταλλάξεις, όπως αυτή του K-ras, οδηγώντας νομοτελειακά, αλλά όχι ταχέως, σε καρκίνο (rate-limiting step) (εικόνα 3, μεσαία σειρά γεγονότων). Αντιθέτως στον σποραδικό καρκίνο, ο σχηματισμός τόσο του αδενώματος, όσο και του καρκινώματος διαδράμουν βραδέως³⁰ (εικόνα 3, άνω σειρά γεγονότων).

2^ο μονοπάτι : Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (Microsatellite instability – MSI - pathway).

Αυτό το μονοπάτι είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη υπερμεταλλαγμένων καρκίνων, και, σε αντίθεση με το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας, προκαλεί ανευπλοειδία σε μικρό βαθμό³⁶. Αναφέρεται ως ο μεταλλαξιογόνος φαινότυπος (mutator phenotype)⁴⁶. Το πρωτότυπο αυτού του μονοπατιού είναι η κληρονομική μορφή MSI και αφορά στο σύνδρομο Lynch (HNPCC, hereditary non-polyposis colorectal cancer). Η κληρονομική μορφή του μονοπατιού αυτού είναι σπανιότερη από τη σποραδική (3% έναντι 12% του συνόλου των περιστατικών ΚΠΕΟ αντίστοιχα²⁸). Συνολικά, το 15% περίπου των ΚΠΕΟ αναπτύσσονται μέσω αυτού του μονοπατιού.

Στο μονοπάτι αυτό δυσλειτουργούν τα ένζυμα του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (mismatch repair - MMR), συνήθως λόγω κληρονομούμενων μεταλλάξεων σε ένα από γονίδια που τα κωδικοποιούν. Τα γονίδια αυτά είναι : το human mutL homolog 1 (h MLH1), το human mutS homolog 2 (h MLS2), το human mutS homolog 6 (h MLH6), το human postmeiotic segregation 1 (h PMS1), το human postmeiotic segregation 2 (h PMS2) και το h MLH3, το οποίο αλληλεπιδρά με το h MLH1. Οι μεταλλάξεις πιο συχνά αφορούν στα MLH1 (3p21) ή MSH2(2p16) (περίπου 30% σε κάθε ένα από αυτά). Τα γονίδια αυτά, όταν δεν είναι μεταλλαγμένα και δεν έχουν δεχθεί επιγενετική τροποποίηση, ελέγχουν την πιστότητα αντιγραφής και επιδιορθώνουν τα λανθασμένα ζευγαρώματα των βάσεων ή τις προσθήκες/ελλείψεις (frameshift mutations) κατά τη φάση S, κατά την οποία γίνεται ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων.

Η συνέπεια της ελλιπούς ικανότητας επιδιόρθωσης είναι να μην διορθώνονται οι μεταλλάξεις σε πολλαπλά γονίδια. Κατά συνέπεια, τα λάθη, τα οποία αναπόφευκτα προκύπτουν κατά τη μεταγραφή του DNA, αθροίζονται βαθμιαία στο γονιδίωμα. Τα γονίδια αυτά, που επηρεάζονται δευτερογενώς, βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα, οι μεταλλάξεις τους όμως είναι γενικά σιωπηλές, επειδή, ως επί το πλείστον, αφορούν σε μη κωδικοποιούμενες περιοχές. Πρακτικά η ελλιπής επιδιόρθωση έχει επιπτώσεις στους **μικροδορυφόρους**, επαναλαμβανόμενες δηλαδή βραχείες (1-6 νουκλεοτίδια) αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Επειδή οι μικροδορυφόροι αποτελούν λειτουργικό τμήμα του υποκινητή αρκετών γονιδίων, περισσότερο επιρρεπή στις μη επιδιορθούμενες frameshift μεταλλάξεις είναι τα γονίδια που έχουν μικροδορυφόρους στον υποκινητή τους. Σε ασθενείς με HNPCC, λόγω των δυσλειτουργούντων γονιδίων επιδιόρθωσης, οι μικροδορυφόροι αυξάνονται ή

μειώνονται σε μέγεθος και είναι ασταθείς (μικροδορυφορική αστάθεια – MSI), δημιουργώντας αλληλία που δεν βρίσκονται στα φυσιολογικά κύτταρα του ιδίου ασθενούς. Αυτή η μικροδορυφορική αστάθεια αποτελεί το βιολογικό χαρακτηριστικό (hallmark) του μονοπατιού της MSI.

Αρκετά κριτικά ρυθμιστικά γονίδια της αύξησης (πρωτο-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια) έχουν τέτοιους μικροδορυφόρους στον υποκινητή τους. Όταν υπάρχει MSI, η έκφραση των γονιδίων αυτών αναστέλλεται ή αποσιωπάται (αδυναμία μεταγραφής). Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι το BAX, το γονίδιο του TCF συστατικού του μονοπατιού της β-κατενίνης, το γονίδιο του υποδοχέα του insulin-like growth factor II και τα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα II του TGF-β. Το BAX κωδικοποιεί την προαποπτωτική πρωτεΐνη BAX, η έλλειψή της επομένως δυνητικά αδρανοποιεί την απόπτωση και ευνοεί την επιβίωση των γενετικά ανώμαλων κλώνων, ενώ ο TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κολονικών επιθηλιακών κυττάρων, και, συνεπώς, οι μεταλλαγμένοι TGF-β υποδοχείς συνεισφέρουν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην εναλλακτική αυτή οδό τα γονίδια K-ras και TP53 είναι φυσιολογικά^{28,46}.

Ο γονότυπος 5 (σύνδρομο Lynch ή HNPCC) είναι ο μοναδικός γονότυπος στον οποίο η MSI είναι ο κυρίαρχο μονοπάτι, ενώ τα άλλα δύο μοριακά μονοπάτια (CIN, CIMP) απουσιάζουν. Απαντάται επίσης στο 15% των σποραδικών ΚΠΕΟ (έχουν υψηλό επίπεδο μικροδορυφορικής αστάθειας, MSI-H), οι οποίοι διακρίνονται εργαστηριακά από το σύνδρομο Lynch με την παρουσία μεταλλαγμένου BRAF γονιδίου σε αυτούς^{28,46}. Παρατηρείται ακόμη στο δρόμο των σποραδικών οδοντωτών αδενωμάτων (βλέπε πιο κάτω μοριακοί γονότυποι 1 και 2) με υψηλό (MSI-H) ή χαμηλό (MSI-L) επίπεδο μικροδορυφορικής αστάθειας. Αν και δεν είναι ο βασικός μηχανισμός μετάπτωσης των οδοντωτών αδενωμάτων σε διηθητικό καρκίνο, πιθανότατα διαδραματίζει κάποιο ρόλο κατά την εξαλλαγή αυτή. Στους γονοτύπους 1 και 2 παρατηρείται επικάλυψη των μονοπατιών 2 (MSI) και 3 (CIMP)⁴¹.

Στου σύνδρομο Lynch, κάθε προσβεβλημένο άτομο κληρονομεί ένα ελαττωματικό αντίγραφο του γονιδίου -βλαστική μετάλλαξη - (first hit), ενώ το δεύτερο αλληλόμορφο του μεταλλάσσεται σε ελαττωματικό (σωματική μετάλλαξη) ή αποσιωπάται επιγενετικά (βλέπε πιο κάτω, μονοπάτι υπερμεθυλίωσης) στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου (second hit). Έτσι, τα MMR γονίδια συμπεριφέρονται ως **ογκοκατασταλτικά γονίδια**, αυτοσωματικά επικρατή ως προς την κληρονομικότητά τους.

Στους σποραδικούς MSI (+) ΚΠΕΟ η ελαττωματική λειτουργία αμφοτέρων των αλληλομόρφων επέρχεται στα επιθηλιακά κολονικά κύτταρα μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης. Σε αντίθεση με το σύνδρομο Lynch, η ελαττωματική λειτουργία του γονιδίου επιδιόρθωσης (MMR) δεν οφείλεται σε ειδική μετάλλαξη του, αλλά σε αποσιώπησή του, η οποία συμβαίνει **επιγενετικά**, λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου (συνήθως του MLH1). Η αποσιώπηση αυτή αφορά και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου, με συνέπεια την αδυναμία μεταγραφής του.

Σε αντίθεση με τους μικροδορυφορικά σταθερούς σποραδικούς ΚΠΕΟ, οι μικροδορυφορικά ασταθείς σποραδικοί όγκοι έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά : συμβαίνουν κυρίως στο δεξιό κόλον, έχουν βλεννώδες στοιχείο σε μεγαλύτερο ποσοστό, είναι λιγότερο διαφοροποιημένοι και οι ασθενείς έχουν καλύτερη επιβίωση^{20,41,46}.

Εργαστηριακά, το επίπεδο της μικροδορυφορικής αστάθειας σταδιοποιείται εργαστηριακά ως υψηλό (MSI-H) και χαμηλό (MSI-L) βάσει του ορίου του 40% : εάν περισσότερο από το 40% των δεικτών αστάθειας που μελετώνται σε έναν όγκο με ανοσοϊστοχημεία είναι θετικοί, ο όγκος χαρακτηρίζεται ως υψηλού επιπέδου, διαφορετικά κατηγοριοποιείται ως χαμηλού επιπέδου^{20,46}.

3^ο μονοπάτι : Το μονοπάτι του φαινοτύπου υπερμεθυλίωσης (CpG Island hypermethylation Phenotype – CIMP- pathway).

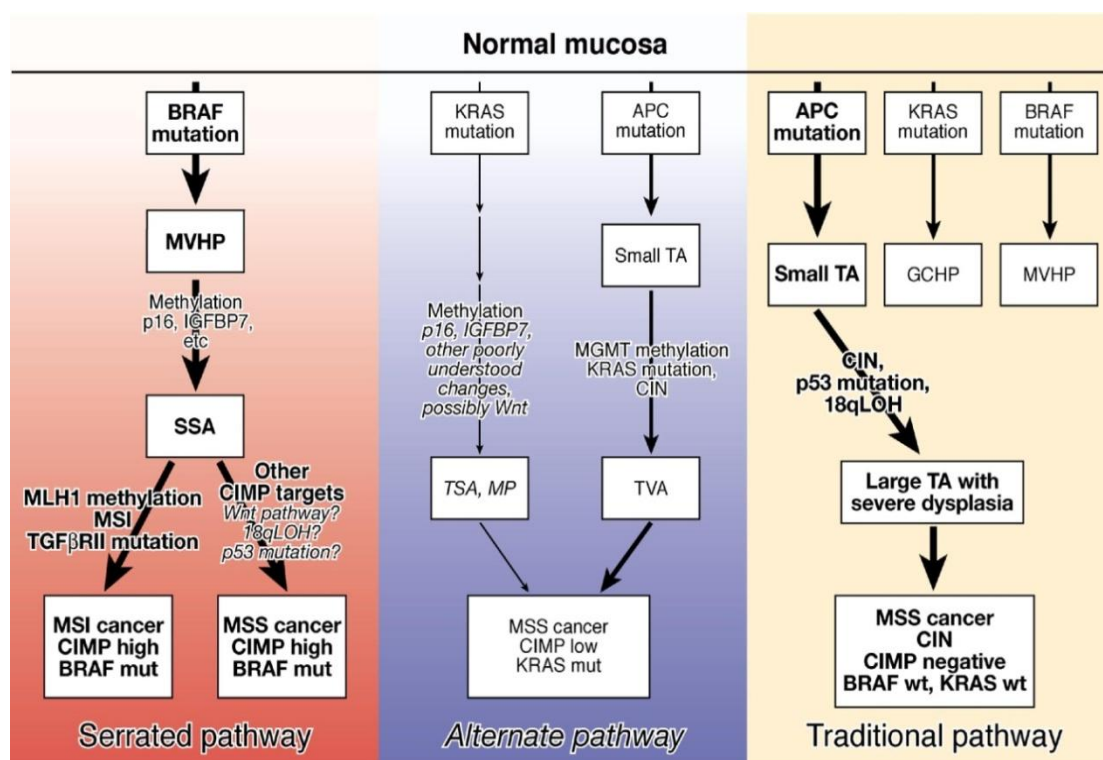
Επιγενετικές αλλαγές, όπως η μεθυλίωση του DNA και η απώλεια του εντυπώματος (imprinting) μπορεί να οδηγήσουν σε μη μεταγραφική συγκεκριμένων γονιδίων, όπως τα προαναφερθέντα γονίδια που επιδιορθώνουν σφάλματα, τα οποία συμβαίνουν κατά τη μεταγραφή του γενετικού υλικού. Η μεθυλίωση, και, ιδίως η υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων δινουκλεοτιδίων CpG (νησιδίων CpG) που βρίσκονται στον υποκινητή των γονιδίων επιδιόρθωσης, κυρίως του MLH1, οδηγεί σε πλήρη αποσιώπηση του αντίστοιχου γονιδίου. Εάν το φαινόμενο αυτό συμβεί σε ευρεία κλίμακα στο γονιδίωμα, ο φαινότυπος που δημιουργείται ονομάζεται CpG Island hypermethylation Phenotype ή CIMP³⁶. Το μονοπάτι αυτό παρατηρείται κυρίως στην οδό γένεσης των οδοντωτών αδενωμάτων και των οδοντωτών καρκινωμάτων⁴². Αναφέρεται στους γονοτύπους 1 και 2 (CIMP-high) και λιγότερο στον γονότυπο 3α (CIMP-low). Για την οδό αυτή δεν είναι απόλυτα σαφές ποια γονίδια μεθυλιώνονται ακριβώς, ποιος είναι ο χρόνος της μεθυλίωσης και της αποσιώπησης των γονιδίων και ποιος παράγοντας καθορίζει την ειδική για τον όγκο μεθυλίωση^{42,43}.

Το imprinting (εντύπωμα) αφορά στην αποσιώπηση έκφρασης ενός εκ των δύο αλληλομόρφων γονιδίων (είτε πατρικής είτε μητρικής προέλευσης) μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή τους, διαδικασία που συμβαίνει στη φάση του ζυγωτού. Η απώλεια του imprinting γίνεται με απομεθυλίωση των υποκινητών των συγκεκριμένων γονιδίων και παρατηρείται συχνά σε καρκινικά κύτταρα. Αν και η απώλεια του imprinting συγκεκριμένων γονιδίων (όπως του γονιδίου του insulin-like growth factor II) έχει στενά συνδεθεί με τους καρκίνους παχέος εντέρου/ορθού με μικροδορυφορική αστάθεια, πιθανόν να αποτελεί απλώς παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου, παρά μοριακό μηχανισμό που συμβάλλει παθογενετικά στην καρκινογένεση.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF συμβαίνουν σχεδόν αποκλειστικά στους σποραδικούς οδοντωτούς καρκίνους παχέος εντέρου και ορθού, οι οποίοι είναι χρωμοσωμικά σταθεροί (διπλοειδείς), και φέρουν μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και τον φαινότυπο υπερμεθυλίωση (CIMP) **ταυτόχρονα** (βλέπε πιο κάτω γονότυποι 1 και 2). Λόγω του αμοιβαίου αποκλεισμού των μεταλλάξεων K-ras και B-RAF, στους γονότυπους 1 και 2 το πρωτοογκογονίδιο K-ras είναι συνήθως φυσιολογικό (wt), ενώ στο γονότυπο 3α το BRAF είναι συνήθως φυσιολογικό (wt)^{28,41}.

Εν τέλει, οι ασθενείς με σποραδικούς καρκίνους παχέος εντέρου με φαινότυπο υπερμεθυλίωσης, χρωμοσωμική σταθερότητα και μικροδορυφορική αστάθεια υψηλού ή χαμηλού επιπέδου και υψηλά ποσοστά BRAF μεταλλάξεων είναι μία **διακριτή κλινική υποομάδα**, με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την ανάπτυξη οδοντωτών πολυπόδων^{28,41}.

Στην εικόνα 5 αναπαριστώνται σχηματικά τα τρία μοριακά μονοπάτια ορθοκολικής καρκινογένεσης, τα οποία ξεκινούν από κοινή αφετηρία (φυσιολογικός ορθοκολικός βλεννογόνο), ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια (διαφορετική αλληλουχία γενετικών γεγονότων) και καταλήγουν σε κοινό προορισμό (ορθοκολικός καρκίνος). Είναι εμφανής η επικάλυψη των μοριακών μονοπατιών 2 (MSI) και 3 (CIMP) στη δημιουργία των οδοντωτών αδενωμάτων και καρκινωμάτων (serrated pathway) : στο γονότυπο 1 (κόκκινο φόντο, αριστερή στήλη) παρατηρούνται υψηλά επίπεδα CIMP και MSI (CIMP-high, MSI-high), στο γονότυπο 2 (κόκκινο φόντο, δεξιά στήλη) παρατηρούνται υψηλά επίπεδα CIMP και χαμηλά επίπεδα MSI (CIMP-high, MSI-low), ενώ στο γονότυπο 3α (μωβ φόντο, αριστερή στήλη) παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα τόσο CIMP όσο και MSI (CIMP-low, MSI-low)⁴¹.



Εικόνα 5 : Τα διαφορετικά μοριακά μονοπάτια της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και το ορθό (από αναφορά 42).

3. Μοριακοί γονότυποι ορθοκολικού καρκίνου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού είναι ανομοιογενής νόσος. Χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα αυξημένη μοριακή πολυπλοκότητα, τέτοια που πολλοί ερευνητές αναφέρονται **στους καρκίνους και όχι στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού** ⁴⁷. Στην πράξη, κάτω από την ομπρέλα του όρου «καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού», συμπεριλαμβάνονται πέντε διαφορετικά και αμοιβαίως αποκλειόμενα μοντέλα καρκινογένεσης, που αντιστοιχούν σε 5 διαφορετικούς μοριακούς γονότυπους (ονοματίζονται με τους αριθμούς αντίστοιχα 1, 2, 3, 4 και 5), οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους στην εναρκτήρια μετάλλαξη που ξεκινά τη διαδικασία της ογκογένεσης, στη χρονική αλληλουχία των γενετικών γεγονότων (γονιδιακές μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανωμαλίες), στο ρόλο που διαδραματίζουν τα πιο συχνά εμπλεκόμενα γονίδια, στον επιμέρους ρόλο του γονιδιακού παράγοντα, στον επιμέρους ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων, στην παθογενετική σημασία της μικροδορυφορικής αστάθειας, στα ενδιάμεσα στάδια που παρεμβάλλονται μεταξύ του φυσιολογικού ιστού και του καρκινικού ιστού, στα συμπτώματα, στην πιθανότητα απάντησης στη θεραπεία, στην πιθανότητα ίασης και στην πρόγνωση ^{35,41,48}. Στους πέντε αυτούς μοριακούς γονότυπους μπορούν να ταξινομηθούν όλες οι μορφές ΚΠΕΟ, ο σποραδικός, ο οικογενής και ο κληρονομικός. Κοινό χαρακτηριστικό και των πέντε μοριακών γονοτύπων είναι ότι ο φαινότυπος του καρκινικού ιστού προκύπτει από την αλληλεπίδραση των γονιδιακών αλλαγών (μεταλλάξεων, χρωμοσωμικών ανωμαλιών και επιγενετικών τροποποιήσεων) με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, σε άλλοτε άλλο βαθμό ²⁸.

Οι γονότυπος 1 μαζί με τον γονότυπο 5 χαρακτηρίζονται από υψηλού επιπέδου μικροδορυφορική αστάθεια και συναποτελούν τον υπερμεταλλαγμένο ενδοφαινότυπο του ορθοκολικού καρκίνου (16% των περιπτώσεων ΚΠΕΟ), ενώ οι γονότυποι 2,3 και 4 χαρακτηρίζονται από κοινού ως ο μη υπερμεταλλαγμένος ενδοφαινότυπος του ορθοκολικού καρκίνου (84% των περιπτώσεων ΚΠΕΟ) ^{32,25}.

Ο **γονότυπος 1 (BRAF serrated polyp pathway)** αναφέρεται στους σποραδικούς καρκίνους, οι οποίοι προκύπτουν από άμισχα οδοντωτά αδενώματα (sessile serrated adenomas) και παρουσιάζουν επίκτητη μικροδορυφορική αστάθεια ⁴¹. Είναι χρωμοσωμικά σταθεροί όγκοι, τα κύτταρά τους δηλαδή εμφανίζουν διπλοειδεία ²⁸. Κυρίαρχο μονοπάτι στην πορεία της ογκογένεσης είναι αυτό του φαινοτύπου υπερμεθυλίωσης (CIMP high) ⁴¹. Η υπερμεθυλίωση εμφανίζεται σε χαμηλά επίπεδα από την αρχή της διαδικασίας και αυξάνεται προοδευτικά κατά τη διαδοχή των σταδίων ⁶⁶ (εικόνα 13a, σελίδα 45). Συνέπεια της υπερμεθυλίωσης είναι να υπερμεθυλιώνονται οι υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η μικροδορυφορική αστάθεια. Η MSI εμφανίζεται σε μεταγενέστερα και όχι σε πρώιμα στάδια της ογκογένεσης ⁴⁹, συμβαίνει λόγω υπερμεθυλίωσης του MLH1³⁰ και αφορά κυρίως στα γονίδια με μικροδορυφόρους (όπως το BAX), τα οποία και απενεργοποιούνται ³⁰. Είναι γνωστοί ως MSI-H σποραδικοί ΚΠΕΟ ²⁸. Ο γονότυπος 1 αποτελεί τον χαρακτηριστικό γονότυπο στον οποίο τα μονοπάτια MSI και CIMP συνεπικουρούν στον ίδιο, μέγιστο βαθμό στην εκκίνηση και προώθηση της καρκινογένεσης. Τα διάδοχα στάδια της ογκογένεσης είναι τα εξής : **1^{ov}** : ανώμαλη μη δυσπλαστική κρυπτική εστία (υπερπλαστική κρυπτική εστία-hyperplastic ACF ⁵⁰), **2^{ov}** : μικροκυστικός υπερπλαστικός πολύποδας (**microvesicular hyperplastic polyp**), **3^{ov}** : οδοντωτός πολύποδας χωρίς δυσπλασία (SSA/SP), **4^{ov}** : οδοντωτός πολύποδας με χαμηλόβαθμη δυσπλασία (SSA/LGD), **5^{ov}** : οδοντωτός πολύποδας με υψηλόβαθμη δυσπλασία (SSA/HGD) και **6^{ov}** : οδοντωτός καρκίνος ⁴⁹ (εικόνα 13a). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι ερευνητές συγκλίνουν στη θέση ότι οι μικροκυστικοί πολύποδες (2^o στάδιο) είναι απίθανο να μετατραπούν σε άμισχα οδοντωτά αδενώματα (3^o

στάδιο), εκτός εάν συμβούν κρίσιμες επίκτητες μοριακές αλλαγές (λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή), που οδηγούν σε απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (όπως του p16 και του υποδοχέα του TGF-β) ^{30,42,43}. Η μετάλλαξη άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων συνήθως απουσιάζει. Έτσι το APC ανευρίσκεται σπάνια μεταλλαγμένο ⁴¹, πιθανόν επειδή ισοδύναμες μεταλλάξεις (πχ στη β-κατενίνη) ευνοούν την επαγωγή της καρκινογένεσης και τη μετάπτωση του φυσιολογικού βλεννογόνου σε ACF ³⁰. Το γονίδιο TP53 συχνότατα δεν ανευρίσκεται μεταλλαγμένο ⁴¹.

Βασική αιτιοπαθογόνος μετάλλαξη είναι αυτή του ογκογονιδίου BRAF ³⁵, η οποία και εμφανίζεται από τα ιδιαίτερος πρώιμα στάδια της ογκογένεσης, από το επίπεδο δηλαδή της ανώμαλης κρυπτικής εστίας ⁴⁹. Στον γονότυπο αυτό, η υπερμεθυλίωση αφορά πολλούς γενετικούς δείκτες, γεγονός συμβατό με τη *γενικευμένη αύξηση της de novo μεθυλίωσης* (πρότυπο CIMP1) ⁵¹. Είναι το μοναδικό μοντέλο (γονότυπος) καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και το ορθό κατά το οποίο το K-ras δεν ανευρίσκεται μεταλλαγμένο ⁴¹, με εξαίρεση την περίπτωση που η μετάλλαξη αυτή εμφανισθεί σε προχωρημένα, μεταστατικά στάδια της νόσου ²⁸. Ενδοσκοπικά τα νεοπλάσματα εντοπίζονται συνηθέστερα στο δεξιό σε σχέση με το αριστερό κόλον και είναι σαφώς περιγεγραμμένα, ενώ ιστολογικά είναι βλενώδη νεοπλάσματα με φτωχή διαφοροποίηση ⁴¹. Αποτελεί το 12% του συνόλου των ΚΠΕΟ ²⁸, ενώ οι γυναίκες προσβάλλονται συχνότερα από τους άνδρες ⁴¹.

Ο **γονότυπος 2** αναφέρεται επίσης σε οδοντωτούς, χρωμοσωμικά σταθερούς, σποραδικούς καρκίνους, οι οποίοι προκύπτουν από άμισχα οδοντωτά αδενώματα (sessile serrated adenomas). Η σειρά των ενδιάμεσων σταδίων είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στο γονότυπο 1 ^{43,49}. Κυρίαρχο μονοπάτι είναι επίσης αυτό του φαινοτύπου της υπερμεθυλίωσης (CIMP high), με πρότυπο ίδιο με αυτό του γονότυπου 1 (πρότυπο CIMP1) ⁵¹. Και στον γονότυπο αυτό τα μοριακά μονοπάτια 2 και 3 επικαλύπτονται ⁴¹, τουλάχιστον στα ενδιάμεσα στάδια της ογκογένεσης ⁶⁶, αλλά η μεθυλίωση του MLH1 είναι μερική (CIMP-high, MSI-low όγκοι) ²⁸. Ομοίως με τον γονότυπο 1 η κυρίαρχη μετάλλαξη είναι η μετάλλαξη του BRAF (**BRAF serrated polyp pathway**) και το APC είναι συνήθως φυσιολογικό ⁴². Οι διαφορές με τον γονότυπο 1 είναι ότι η μικροδορυφορική αστάθεια είτε ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα (καρκίνοι MSI-L), ενδεχομένως και να απουσιάζει (MSS) ⁴¹ και το γεγονός ότι η μετάλλαξη στο ογκογονίδιο K-ras, αν και όχι συχνή, ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ορισμένες υποπεριπτώσεις στην επαγωγή της καρκινογένεσης ⁴¹. Το πρότυπο αυτό καρκινογένεσης απαντάται στο 8 % των περιπτώσεων ΚΠΕΟ ²⁸, ενώ οι γυναίκες προσβάλλονται επίσης συχνότερα από τους άνδρες ⁴¹.

Ο **γονότυπος 3** αναφέρεται σε χρωμοσωμικά ασταθείς σποραδικούς ορθοκολικούς καρκίνους, οδοντωτούς ή αδενωματώδεις ^{28, 43}. Παρατηρείται στο 20% των ορθοκολικών καρκίνων και είναι συχνότερος στο ανδρικό φύλο και στο αριστερό κόλον ⁴¹. Κυρίαρχο μονοπάτι είναι αυτό της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN), η οποία δεν οφείλεται ούτε σε μικροδορυφορική αστάθεια (αυτή εμφανίζεται σε χαμηλά επίπεδα ⁴¹, είναι καρκίνοι δηλαδή στην μεγάλη τους πλειονότητα MSS και σπανιότερα MSI-L ⁴³), ούτε σε υπερμεθυλίωση (είναι καρκίνοι CIMP-low και το γονίδιο επιδιόρθωσης MLH1 δεν είναι μεθυλιωμένο ²⁸). Αντιθέτως έχει βρεθεί ότι η χρωμοσωμική αστάθεια οφείλεται στην πολύ συχνά παρατηρούμενη ανευπλοειδία ^{28,41} (η ανευπλοειδία αθροίζεται σταδιακά ήδη από το αρχικό στάδιο της ανώμαλης δυσπλαστικής κρίσης ⁶⁷) και φθάνει σε κριτικά επίπεδα στο επίπεδο του αδενώματος με υψηλόβαθμη δυσπλασία ⁴⁹. Η CIN αφορά και σε απώλεια του TP53 ²⁸, το οποίο απενεργοποιείται συχνά στο γονότυπο αυτό ⁴¹.

Ο γονότυπος 3 παρουσιάζει υποπεριπτώσεις, ανάλογα με την πρόδρομη αλλοίωση. Η πρόδρομη αλλοίωση ενδέχεται να είναι ο οδοντωτός πολύποδας, που οδηγεί σε οδοντωτό καρκίνωμα (K-ras serrated polyp pathway ⁴⁹), είναι δυνατόν όμως να το σωληνολαχνωτό αδένωμα, το οποίο καταλήγει σε μη οδοντωτό καρκίνωμα ⁴³. Σε αμφότερες τις υποπεριπτώσεις του γονότυπου 3 η K-ras μετάλλαξη είναι η βασική οδηγός μετάλλαξη ^{28,43}. Μάλιστα ο γονότυπος 3 θεωρείται ο βασικός γονότυπος, στον οποίο το ογκογονίδιο K-ras διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εκκίνηση και προώθηση της καρκινογένεσης ²⁸. Λόγω του αμοιβαίου αποκλεισμού των μεταλλάξεων K-ras/BRAF, στο γονότυπο αυτό η μετάλλαξη BRAF απουσιάζει ⁴¹.

Το μονοπάτι της οδοντωτής καρκινογένεσης που σχετίζεται με το K-ras (**K-ras serrated polyp pathway, γονότυπος 3α**) αφορά στο 20% περίπου των περιπτώσεων οδοντωτής ορθοκολικής καρκινογένεσης ⁵⁰ και περιλαμβάνει τα ακόλουθα διάδοχα στάδια : **1^{ov}** : ανώμαλη μη δυσπλαστική κρυπτική εστία (υπερπλαστική κρυπτική εστία- hyperplastic ACF ⁵⁰), **2^{ov}** : υπερπλαστικός πολύποδας εκ καλυκοειδών κυττάρων (goblet cell hyperplastic polyp), **3^{ov}** : παραδοσιακά οδοντωτά αδενώματα με χαμηλόβαθμη δυσπλασία (TSA-LGD), **4^{ov}** : παραδοσιακά οδοντωτά αδενώματα με υψηλόβαθμη δυσπλασία (TSA-HGD) και **5^{ov}** : οδοντωτός καρκίνος ^{43,49}. Η μετάλλαξη K-ras συμπίπτει με την απόκτηση του φαινοτύπου υπερμεθυλίωσης σε μικρό βαθμό (CIMP-low όγκοι) ²⁸ και συμβάλλει στην απόκτηση της χαμηλόβαθμης δυσπλασίας ^{37,49}. Στο γονότυπο αυτό η επικάλυψη των μοριακών μονοπατιών 2 και 3 είναι ισχυρή (CIMP-low, MSI-low όγκοι) ⁴¹. Αμφότερα τα μοριακά γεγονότα (μετάλλαξη K-ras, φαινότυπος υπερμεθυλίωσης) συμβαίνουν σε όχι ιδιαίτερα πρώιμα στάδια της διαδικασίας, ενώ η υπερμεθυλίωση παραμένει σε σταθερά χαμηλά επίπεδα από τη στιγμή που εμφανίζεται μέχρι και το στάδιο του καρκίνου ⁶⁶. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης (η οποία έπεται της K-ras μετάλλαξης) συμπίπτει με την έναρξη της άθροισης της ανευπλοειδίας ²⁸ και συμβάλλει στην απόκτηση της υψηλόβαθμης δυσπλασίας ⁴³ (εικόνα 13b, σελίδα 45).

Στη δεύτερη υποπερίπτωση του γονότυπου 3 (**γονότυπος 3β**) το αρχικό μοριακό γεγονός είναι η απενεργοποίηση του APC, η οποία οδηγεί σε ανώμαλη δυσπλαστική κρυπτική εστία και σε αδένωμα με χαμηλόβαθμη δυσπλασία. Η μετάλλαξη K-ras ακολουθεί και έχει τεκμηριωθεί ότι είναι αυτή που οδηγεί το αδένωμα στο να αποκτήσει υψηλόβαθμη δυσπλασία ⁴³. Τα διάδοχα στάδια που οδηγούν στην καρκινογένεση είναι **1^{ov}** : ανώμαλη κρυπτική δυσπλαστική εστία (dysplastic ACF) ⁵⁰, **2^{ov}** : σωληνολαχνωτό αδένωμα με χαμηλόβαθμη δυσπλασία ^{43,50}, **3^{ov}** : σωληνολαχνωτό αδένωμα με υψηλόβαθμη δυσπλασία ⁴³ και **4^{ov}** : μη οδοντωτός καρκίνος. Αποτελεί την ομάδα των CIMP-low ορθοκολικών καρκίνων, με πολύ συχνές K-ras μεταλλάξεις (92%). Η υπερμεθυλίωση επιδεικνύει πυκνό πρότυπο μεθυλίωσης που είναι εντοπισμένη και περιορίζεται σε λίγα γονίδια (πρότυπο CIMP2) ⁵¹. Είναι πιθανόν ότι υπάρχει συνέργεια μεταξύ της μετάλλαξης K-ras και του συγκεκριμένου προτύπου υπερμεθυλίωσης και ότι η συνέργεια αυτή είναι αναγκαία για να επάγει πρώιμα γενετικά γεγονότα, ικανά να εκκινήσουν την ογκογένεση στην υποομάδα αυτή του ΚΠΕΟ ⁴¹. Αυτό που είναι δεν είναι γνωστό είναι το κατά πόσο συντελεί η K-ras μετάλλαξη, όταν είναι παρούσα, στην απώλεια του APC, το οποίο είναι το εναρκτήριο γεγονός (βλέπε κεφάλαιο 8).

Ο **γονότυπος 4** αποτελεί τον **παραδοσιακό γονότυπο** του ορθοκολικού καρκίνου. Είναι ο πιο συχνά απαντώμενος γονότυπος ΚΠΕΟ και αντιπροσωπεύει το 57% των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου ⁴¹. Αντιστοιχεί σε σποραδικούς ή κληρονομικούς αδενωματοδείς, μη οδοντωτούς, ορθοκολικούς καρκίνους, με κυρίαρχο μονοπάτι αυτό της σχετιζόμενης με ανευπλοειδία χρωμοσωμικής αστάθειας, ενώ η μικροδορυφορική αστάθεια και η

υπερμεθυλίωση απουσιάζουν^{28,41,43}. Ο γονότυπος αυτός παρουσιάζει όμοια διάδοχα στάδια με τον γονότυπο 3β^{43,50} και η κυρίαρχη μετάλλαξη είναι αυτή στο *K-ras*²⁸. Η μετάλλαξη στο *APC* είναι, ομοίως, αυτή που δείχνει να προηγείται χρονικά⁴³. Η απενεργοποίηση ή η απώλεια του *TP53* είναι συχνή και συμβάλλει, μαζί με την απώλεια της ετεροζυγωτίας σε συγκεκριμένους χρωμοσωμικούς τόπους όπως σε αυτούς του χρωμοσώματος 18, στη χρωμοσωμική αστάθεια^{30,41}.

Η κληρονομική της μορφή αφορά στην οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (FAP), που οφείλεται σε βλαστικές μεταλλάξεις του *APC* και στην MAP polyposis, που σχετίζεται με βλαστικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *MUTYH*. Στη FAP, το αδένωμα δημιουργείται, αρκετά γρήγορα, στις δύο πρώτες δεκαετίες της ζωής²⁵, λόγω βλαστικής μετάλλαξης σε ένα από τα δύο αλληλία του *APC* (rate-increasing step), ενώ η προσθήκη πολλαπλών ανεξάρτητων μεταλλάξεων, όπως αυτή στο *K-ras* (rate-limiting step), οδηγεί αργά σε αδένωμα με υψηλόβαθμη δυσπλασία και καρκίνο (εικόνα 3, μεσαία σειρά γεγονότων)³⁰.

Στη σποραδική μορφή του γονότυπου, πολλαπλές ανεξάρτητες μεταλλάξεις ενεργοποιούν το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης οδηγώντας βραδέως σε δημιουργία δυσπλαστικών ACF και αδενώματος (rate-limiting step), ενώ η προσθήκη πολλαπλών ανεξάρτητων μεταλλάξεων, κυρίως αυτή του *K-ras* οδηγεί, επίσης βραδέως, στην πρόοδο προς το καρκίνωμα (rate-limiting step)³⁰. Αυτές οι μεταβολές αθροίζονται σε βάθος δεκαετιών (εικόνα 3, άνω σειρά γεγονότων)^{31,32,34}. Είναι συχνότερος στους άνδρες και εντοπίζεται κυρίως στο αριστερό κόλον⁴¹.

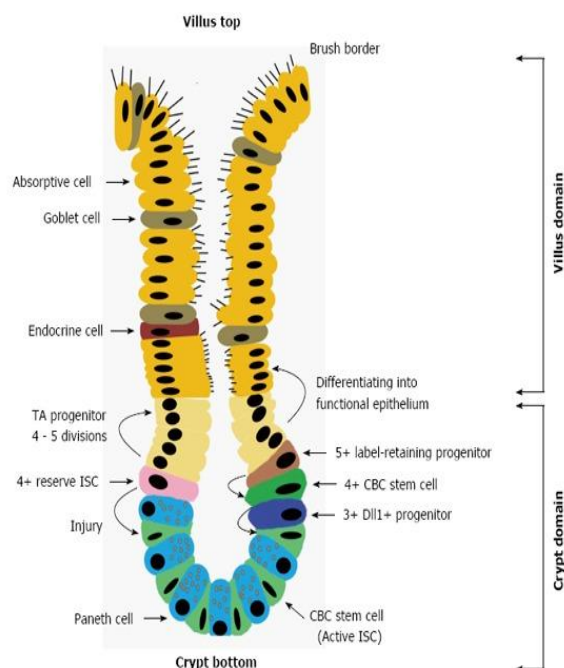
Ο γονότυπος 5 είναι συνώνυμος με τον κληρονομικό μη πολυποδιασικό ορθοκολικό καρκίνο (HNPCC ή σύνδρομο Lynch). Είναι η κληρονομική μορφή της μικροδορυφορικής αστάθειας. Ανήκει στους ορθοκολικούς καρκίνους με υπερμεταλλαγμένο ενδοφαινότυπο, όπου η κυρίαρχη μορφή γενωμικής αστάθειας είναι η μικροδορυφορική αστάθεια. Είναι χρωμοσωμικά σταθεροί καρκίνοι, CIMP αρνητικοί. Τα ενδιάμεσα στάδια είναι αυτά των γονοτύπων 4 και 3β^{28,43,50}. Πολλαπλές ανεξάρτητες σωματικές μεταλλάξεις, όπως αυτές των *APC/K-ras* συμβάλλουν αργά στη δημιουργία αδενώματος (rate-limiting step), το οποίο υπό την επίδραση αλληλίων που αφορούν στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA (βλαστικές μεταλλάξεις ή σωματική απενεργοποίηση), αποκτά γρήγορα υψηλόβαθμη δυσπλασία και μετατρέπεται σε καρκίνο (rate-increasing step, εικόνα 3, κάτω σειρά γεγονότων)³⁰. Η μετάλλαξη *BRAF* απουσιάζει⁴¹, ενώ η απενεργοποίηση του *TP53* ενδέχεται να συμβάλλει εν μέρει στην μετάβαση του αδενώματος σε προχωρημένα στάδια³⁰. Αποτελεί το 3% του συνόλου των ορθοκολικών καρκίνων, οι άνδρες προσβάλλονται περισσότερο από τις γυναίκες και οι καρκίνοι εντοπίζονται συχνότερα στο δεξιό κόλον⁴¹.

4. Η βιολογία της φυσιολογικής κολονικής κρύπτης

Η πλειονότητα των ορθοκολονικών καρκίνων αναπτύσσονται αργά από τα καλοήγη αδενώματα^{51,52}. Τα αδενώματα προέρχονται από τις ανώμαλες κολονικές κρύπτες. Οι τελευταίες συμβαίνουν ως αποτέλεσμα των γενετικών αλλαγών, οι οποίες εμφανίζονται στα κύτταρα του κολονικού επιθηλίου. Ανατομικά, οι φυσιολογικές κολονικές κρύπτες αποτελούν από δομές με τη μορφή κοίλανσης εντός του κολονικού επιθηλίου. Κάθε μία περιέχει περίπου 2.000-3.000 κύτταρα. Κάθε κρύπη είναι λειτουργικά αυτόνομη, ένα κλειστό σύστημα, που οφείλει την ύπαρξή του στα δικά του κύτταρα⁵³, παρότι η αгаστή συνεργασία με τις παρακείμενες κρύπτες είναι απαραίτητη για την ομοιόσταση του βλεννογόνου^{54,55}.

Η κρύπη σχηματίζει άξονα, ιστολογικό και λειτουργικό ταυτόχρονα. Στο κάτω 1/3 του άξονα (crypt domain, περιοχή της κρύπτης) εδράζονται τα προγονικά βλαστικά ή αρχέγονα κύτταρα (stem cells), τα οποία, διαφοροποιούμενα σε ώριμα κύτταρα, παράγουν τον πληθυσμό όλων των υπόλοιπων κυττάρων της κρύπτης. Στα ανώτερα δύο τριτημόρια του άξονα (το τμήμα της κρύπτης που καταλήγει στον αυλό - villous domain, λαχνωτή περιοχή) εντοπίζεται το διαφοροποιημένο και λειτουργικό επιθήλιο (εικόνα 6)⁵⁶. Η μετάβαση από τη μία περιοχή της κρύπτης στην άλλη γίνεται βαθμιαία · υπάρχει μία μεταβατική ζώνη (sweet spot), η οποία οριοθετεί την περιοχή της κρύπτης από τη λαχνωτή περιοχή (εικόνα 8, αριστερή στήλη).

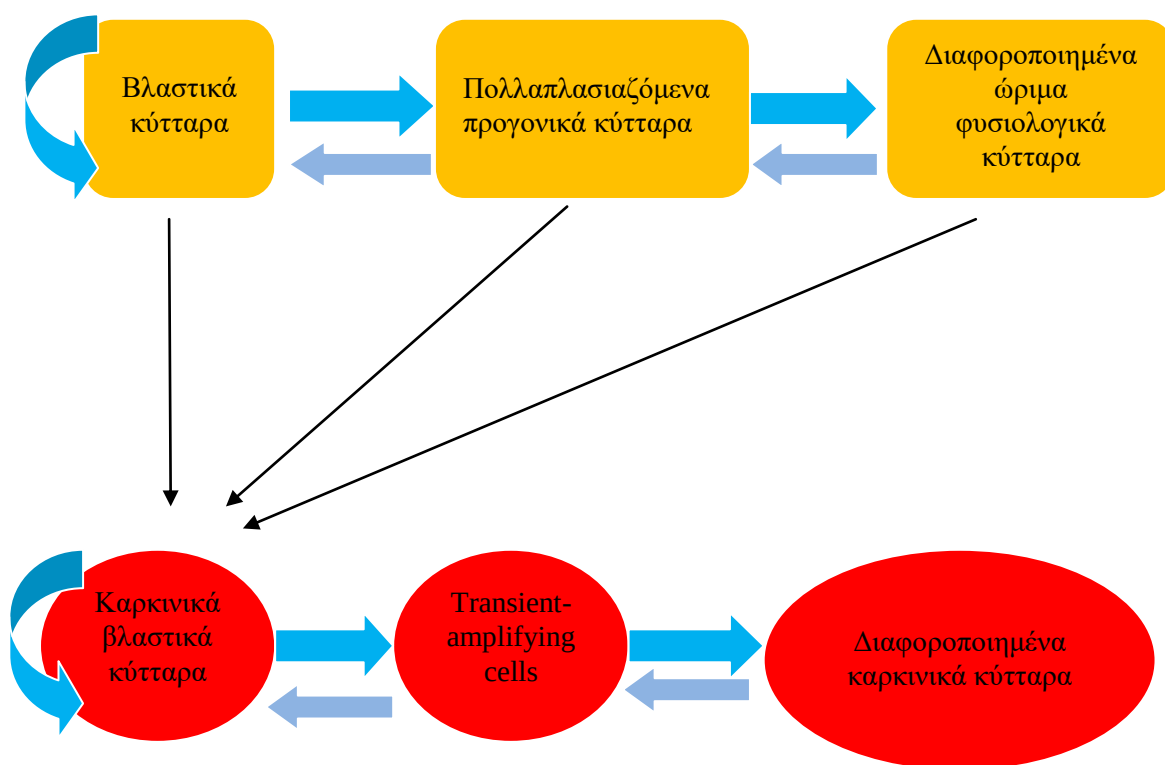
Όλα τα κύτταρα κάθε συγκεκριμένης κολονικής κρύπτης παράγονται από τον πολλαπλασιασμό ενός και μοναδικού αρχέγονου κυττάρου (stem cell). Συνεπώς κάθε κολονική κρύπη είναι μονοκλωνική δομή⁵⁴. Το κολονικό επιθήλιο υφίσταται συνεχή και γρήγορη ανανέωση. Αντικαθίσταται κάθε 5 ημέρες μέσω της ανανέωσης των κρυπτών. Επειδή το παχύ έντερο περιέχει περίπου 10^{11} κύτταρα, περίπου 10 τρισεκατομμύρια κολονικά κύτταρα παράγονται περίπου κάθε χρόνο στο μέσο ενήλικα από τα κολονικά βλαστικά κύτταρα⁵³.



Εικόνα 6 : Η δομή του άξονα της φυσιολογικής κολονικής κρύπτης (από αναφορά 56).

Πρακτικά, τα αρχέγονα κολονικά κύτταρα αποτελούν μόλις το 1% των κυττάρων της φυσιολογικής κρύπτης. Γενικά η κύρια εντόπισή τους είναι η βάση και η άμεσα κοντινή περιοχή της βάσης της κρύπτης, όπου και παραμένουν σε φάση ηρεμίας, διάγοντας μακρό χρόνο ζωής. Δεν μεταναστεύουν προς την κορυφή της κρύπτης. Διατηρούν τα ίδια τον αριθμό τους σταθερό, ενώ ταυτόχρονα παράγουν τα γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά φυσιολογικά κύτταρα (transit-amplifying cells, t-a cells), τα οποία ονομάζονται και ωριμάζοντα κύτταρα (εικόνες 7 και 10). Τα ωριμάζοντα κύτταρα καθώς μεταναστεύουν προς το άνω μέρος του άξονα των κρυπτών, ταυτόχρονα πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και ωριμάζουν : διαφοροποιούνται σταδιακά προς όλους τους τύπους των ωριμαζόντων διαφοροποιημένων κολονικών κυττάρων και τελικά γίνονται απόλυτα ώριμα διαφοροποιημένα κύτταρα όλων των τύπων (απορροφητικά κυλινδρικά, ενδοκρινικά κύτταρα και αυτά που παράγουν βλέννα)⁵³. Τα ώριμα κύτταρα αποπίπτουν (αποφολιδώνονται) από την κορυφή της κρύπτης προς τον αυλό του παχέος εντέρου. Ακολουθώντας, αντικαθίστανται φυσιολογικά από τους απογόνους των προγονικών κυττάρων⁵⁷. Η ανανέωση, επομένως, των κρυπτών οφείλεται και εξαρτάται από τη φυσιολογική λειτουργία των προγονικών κυττάρων, τα οποία είναι ο παράγοντας-κλειδί για την ομοιόσταση και τη βιωσιμότητα των κρυπτών⁵⁷. Ο σταθερός αριθμός των κυττάρων και η φυσιολογία της κάθε μίας ξεχωριστής κρύπτης εξαρτάται από τη ρύθμιση της φυσιολογίας των βλαστικών κυττάρων αυτής.

Πέρα από τον ιδιαίτερα σπουδαίο ρόλο τους στη φυσιολογία και στη διατήρηση της δομής του επιθηλίου του κόλου, έχει αποδειχθεί ότι τα κολονικά αρχέγονα (βλαστικά) κύτταρα είναι η ρίζα του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς ο ΚΠΕΟ είναι νόσος των προγονικών κολονικών κυττάρων⁵⁴⁻⁵⁶ και πηγάζει από τα βλαστικά κύτταρα της βάσης των κρυπτών και όχι από τους απογόνους τους (εικόνα 7).

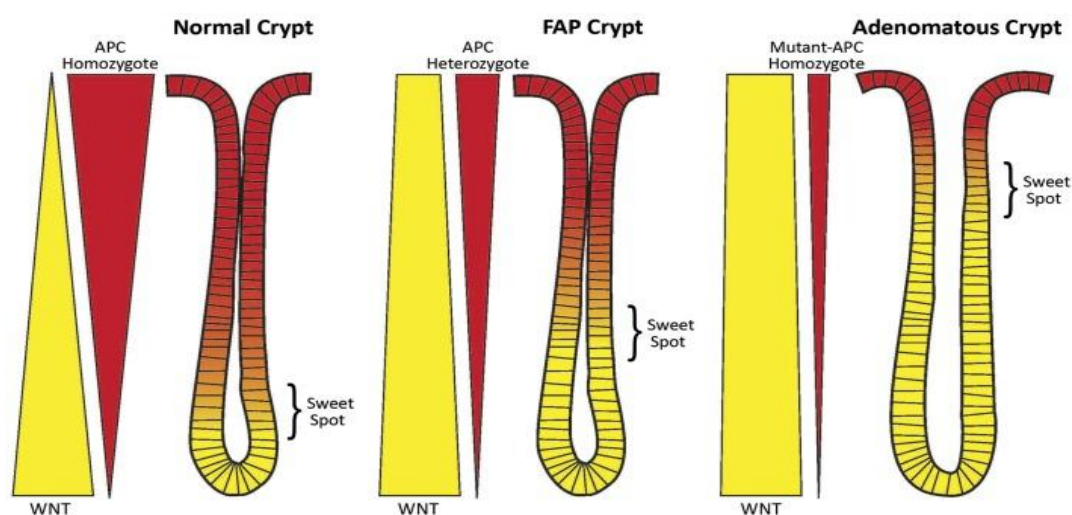


Εικόνα 7 : Η σχέση των φυσιολογικών και των καρκινικών αρχέγονων κυττάρων (stem cells) του παχέος εντέρου τόσο μεταξύ τους όσο και με τα αντίστοιχα ωριμάζοντα και διαφοροποιημένα κύτταρα (βασισμένο στις αναφορές 55 και 58).

Η ιδιότητα της «βλαστικότητα» των αρχέγονων κολονικών κυττάρων (η ικανότητά τους να αυτοαναπαράγονται ασύμμετρα, διατηρώντας τον πληθυσμό τους αμείωτο, και ταυτόχρονα να διαφοροποιούνται προς όλα τα ώριμα κολονικά κύτταρα) και η ικανότητα των μεταμορφούμενων κολονικών κυττάρων να εγκαθίστανται και να κυριαρχούν στις κολονικές κρύπτες απαιτεί την *ενεργοποίηση* του βιοχημικού μονοπατιού Wnt/APC/β-κατενίνης. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται (πυροδοτείται) υπό την επίδραση Wnt σημάτων, αλλά εξαρτάται από τη δράση της β-κατενίνης. Η β-κατενίνη είναι το κεντρικό μόριο για τη διατήρηση της ομοιόστασης των βλαστικών κυττάρων στη βάση της κρύπτης. Τα Wnt σήματα δρουν αποκολλητικά, αποσταθεροποιώντας το σύμπλοκο της APC με την glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β). Επειδή η κύρια αποστολή αυτού του συμπλόκου είναι η φωσφορύλιωση και κατά συνέπεια η αποδόμηση (πρωτεασομική και βάσει ubiquitin) της β-κατενίνης από την APC (εικόνα 14 - αριστερό τμήμα), η αποσταθεροποίησή του επιτρέπει στη β-κατενίνη να διαφύγει την καταστροφή της από την APC⁵⁵ (εικόνα 14 - δεξιό τμήμα).

Όταν τα Wnt σήματα απουσιάζουν, η φυσιολογική APC αποδομεί τη φυσιολογική β-κατενίνη, με συνέπεια την αδυναμία επαγωγής κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁴⁰. Στον αντίποδα, όταν τα σήματα στους υποδοχείς Wnt αυξάνουν ή όταν το μόριο APC είναι δυσλειτουργικό (συνεπεία μεταλλαγμένου APC), η β-κατενίνη δεν αποδομείται. Όντας δομικά άθικτη, η β-κατενίνη αθροίζεται στο κυτταρόπλασμα και μεταναστεύει ακέραιη στον πυρήνα. Στον πυρήνα συνδέεται με τον TCF, επάγοντας τη μεταγραφή και επιταχύνοντας τον πολλαπλασιασμό^{39,40,59} (εικόνα 14 - δεξιό τμήμα, εικόνα 16).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κατά μήκος του άξονα της κρύπτης παρατηρούνται σημαντικές βαθμιδώσεις: στα προγονικά βλαστικά κύτταρα της βάσης τα Wnt σηματοδοτικά σήματα είναι αυξημένα, η συγκέντρωση της APC μειωμένη και η συγκέντρωση της β-κατενίνης αυξημένη (ON state της β-κατενίνης). Κατά τη μετάβαση προς τη villous domain, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης APC σταδιακά αυξάνεται, η κυτταροπλασματική και πυρηνική συγκέντρωση της β-κατενίνης σταδιακά μειώνεται (OFF state της β-κατενίνης, εικόνα 10, αριστερό τμήμα⁵⁶), ενώ τα σηματοδοτικά Wnt σήματα βαθμιαία μειώνονται (εικόνα 8, αριστερή στήλη)⁵³.



Εικόνα 8 : Η βαθμίδωση των Wnt σημάτων και της συγκέντρωσης της APC πρωτεΐνης κατά μήκος του άξονα της φυσιολογικής και της αδενωματοδούς κολονικής κρύπτης (από αναφορά 53).

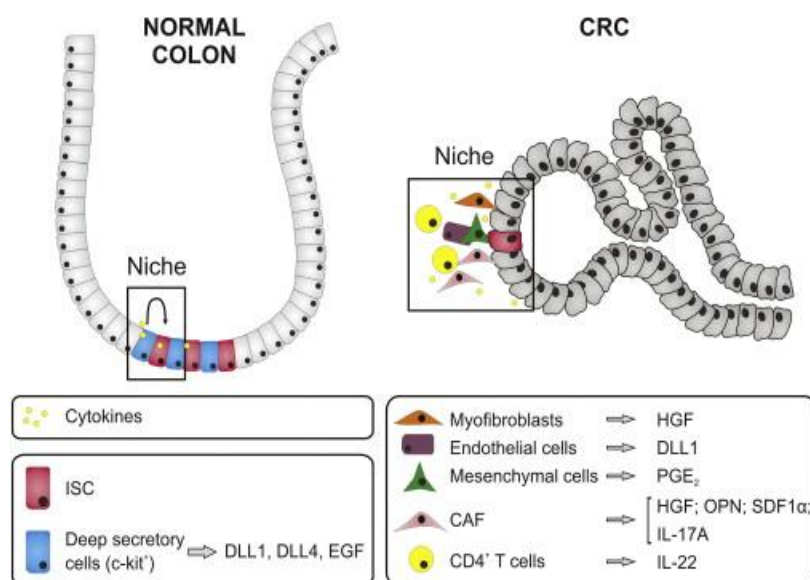
Τα προαναφερθέντα γεγονότα είναι αλληλοεξαρτώμενα. Στα αρχέγονα κύτταρα της βάσης τα επίπεδα της β-κατενίνης είναι αυξημένα, λόγω πληθώρας των σημάτων στους Wnt υποδοχείς⁵³. Αυτό οδηγεί σε ενίσχυση της «βλαστικότητα», αύξηση του πολλαπλασιασμού των stem cells, αύξηση του ποσοστού μετατροπής τους σε t-a cells και αύξηση της μετανάστευσης των τελευταίων προς της επιφάνεια των κρυπτών. Λόγω της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων (παράγονται από τα κύτταρα του στρώματος, πέριξ των κρυπτών^{54-56,58}) και λόγω της σταδιακής μείωσης της συμύκνωσης της χρωματίνης (ανοικτής και κλειστής) που παρατηρείται από τη βάση προς την κορυφή της κρύπτης, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του γονιδίου APC κατά τη μετάβαση από τη βάση προς τη μεσότητα και από εκεί προς την κορυφή της κρύπτης. Αυτό οδηγεί σε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της φυσιολογικής πρωτεΐνης APC στα μεταναστεύοντα ωριμάζοντα κύτταρα.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της APC έχει δύο συνέπειες : 1^{οη} αποδομεί την β-κατενίνη, και, 2^{οη} επάγει την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση της Wnt σηματοδότησης, με συνέπεια τα Wnt σήματα να μειώνονται βαθμιαία από τη βάση προς την κορυφή της κρύπτης. Τελικό κοινό αποτέλεσμα των συνεπειών αυτών είναι η OFF state της β-κατενίνης (εικόνα 10, αριστερό τμήμα) στην λαχνωτή περιοχή : η απουσία των «αποκολλητικών» Wnt σημάτων επιτρέπει στην φυσιολογική APC που αθροίζεται σταδιακά στα μεταναστεύοντα κύτταρα να εγκλωβίσει την β-κατενίνη στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας στην πρωτεόλυσή της. Επειδή η β-κατενίνη φυσιολογικά προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα μεταναστεύοντα κύτταρα, που περιέχουν όλο και μικρότερες συγκεντρώσεις β-κατενίνης, αδυνατούν να πολλαπλασιασθούν περαιτέρω. Αυτές οι αλλαγές έχουν ως συνέπεια κριτικές αλλαγές στη λαχνωτή περιοχή : ο κυτταρικός κύκλος σταματά, τα t-a cells διαφοροποιούνται, αθροίζουν βαθμιαία γενετικές αλλαγές και αποφολιδώνονται στον εντερικό αυλό μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης (εικόνα 8, αριστερή στήλη, εικόνα 10, αριστερό τμήμα)⁵³.

Στη φυσιολογική αυτή διαδικασία, με τους υψηλούς ρυθμούς ανανέωσης, το κολονικό επιθήλιο καθίσταται πεδίο εύκολης στόχευσης για τους μεταλλαξιογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στην πράξη, ο κολονικός βλεννογόνος σχηματίζει «θερμή εστία», στην οποία, τα εξωγενή αντιγόνα που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κοπρανώδες περιβάλλον βρίσκουν την ευκαιρία να προκαλέσουν βλαβερές γενετικές τροποποιήσεις στα πολλαπλασιαζόμενα κολονικά κύτταρα (κυρίως στα αρχέγονα αλλά και λιγότερο στα ωριμάζοντα), τις οποίες και αθροίζουν στη συνέχεια^{47,60}.

5. Η παθολογία της δυσπλαστικής και της υπερπλαστικής κολονικής κρύπτης

Ανεξαρτήτως των μοριακών γεγονότων, από τα οποία ξεκινά η ογκογόνος διαδικασία στο παχύ έντερο και το ορθό, οι αρχικές αλλοιώσεις συμβαίνουν στην εσοχή της κρύπτης (niche), όπου και εδράζουν τα φυσιολογικά κολονικά βλαστικά κύτταρα ^{54,58}. Η εσοχή αποτελεί το εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον, το απαραίτητο για την ομοιόσταση των βλαστικών κυττάρων (εικόνα 9) ⁵⁸.



Εικόνα 9 : Σχηματική αναπαράσταση της εσοχής (niche) των αρχέγονων ή βλαστικών κυττάρων (stem cells) στο φυσιολογικό παχύ έντερο/ορθό και στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού (από αναφορά 58).

Βάσει του αποδεκτού προτύπου, η αρχική μετάλλαξη (στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι αποδεκτό ότι αυτή είναι η μετάλλαξη του APC ⁵⁵ ή ισοδύναμες μεταλλάξεις στο μονοπάτι Wnt) εκκινεί μία σειρά μεταλλάξεων, που δρουν σε διαφορετικά μονοπάτια η κάθε μια (πχ *K-ras*, *TP53*, *Smad4*) ⁵⁶. Η αρχική αυτή μετάλλαξη στο ένα αλληλίο του APC (1st hit) συμβαίνει εντός ενός αρχικού βλαστικού κυττάρου στην εσοχή της κρύπτης (APC wt/mt stem cell), και ακολουθείται από ασύμμετρη (q) διαίρεσή του. Με αυτή τη διαίρεση αφενός μεν διατηρείται ο αρχικός πληθυσμός των stem cells, αφετέρου δε παράγεται πληθυσμός απογόνων από ίδια με το αρχικό προγονικά κύτταρα (κλώνος από APC wt/mt stem cells). Ο πληθυσμός αυτός των απογόνων των stem cells υφίσταται συμμετρική (p) διαίρεση. Επειδή, εκ παραλλήλου, τα γειτονικά φυσιολογικά stem cells υφίστανται συμμετρική (r) διαίρεση, παράγουν δηλαδή μόνο τους απογόνους τους και όχι τον εαυτό τους, τελικά ο πληθυσμός τους μηδενίζεται. Τελικά, η εσοχή πληρούται με τον κλώνο των μεταλλαγμένων APC wt/mt stem cells (niche succession) ⁵⁴. Ακολούθως, ο κλώνος επεκτείνεται από τη βάση προς την κορυφή της κρύπτης, αντικαθιστώντας όλα τα κύτταρά της (μονοκλωνική μετατροπή της κρύπτης) ⁵⁵. Η αρχική διαίρεση της μονοκλωνικής κρύπτης σε δύο όμοιες και οι συνακόλουθες διαιρέσεις αυτών οδηγούν σε πεδίο με όμοιες APC wt/mt κρύπτες, των οποίων τα stem cells είναι σε αυξημένο κίνδυνο να αποκτήσουν δεύτερη APC μετάλλαξη.

Για να συμβεί αυτή η 2^η μετάλλαξη (2nd hit), πρέπει το προγονικό κύτταρο να μεταφερθεί από την εσοχή της κρύπτης στην αρχή της μεταβατικής ζώνης. Εκεί, λόγω της επίδρασης της

μετάλλαξης *K-ras* καθώς και άλλων μεταλλάξεων, το προγονικό κύτταρο χάνει την ετεροζυγωτία του (LOH) και μετατρέπεται σε *APC* mt/mt stem cell. Στο κύτταρο αυτό αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός και μειώνεται η απόπτωση και η μετανάστευση. Συνέπεια των αλλαγών αυτών είναι πρωτίστως η καινούργια πλήρωση της εσοχής με τον κλώνο *APC* mt/mt stem cell, ο οποίος προοδευτικά αντικαθιστά τον *APC* wt/mt κλώνο (further niche succession)⁵⁴. Ο κλώνος αυτός προέρχεται από συμμετρική διαίρεση των “καρκινικών” αρχέγονων κυττάρων της εσοχής και μεταναστεύει προς την κορυφή της κολονικής κρύπτης, διευρύνοντας την περιοχή πολλαπλασιασμού εντός της κρύπτης⁵⁸. Απώτερες συνέπειες, ως εκ τούτου, είναι η επέκταση της crypt domain (περιοχή της κρύπτης) προς την κορυφή της κρύπτης και η μετακίνηση της μεταβατικής ζώνης προς το άνω τριτημόριο της κρύπτης (εικόνα 8, δεξιά στήλη, εικόνα 15)⁵³.

Τελικά, η κρύπτη υφίσταται καινούργια μονοκλωνική μετατροπή (μονοκρυπτικό αδένωμα). Το μονοκρυπτικό αδένωμα θεωρείται ως η πρωιμότερη ιστολογικά ανιχνεύσιμη πρόδρομη αλλοίωση της διαδικασίας της ορθοκολικής καρκινογένεσης⁵⁴. Η επακόλουθη διαίρεση-σχάση αυτού του μονοκρυπτικού *APC* mt/mt αδενώματος, η οποία γίνεται ασύμμετρα⁵³, οδηγεί σε καρκινοποίηση του πεδίου και στο σχηματισμό του πρώιμου αδενώματος, το οποίο είναι επίσης μονοκλωνικό.

Στην κρύπτη, η οποία εξελίσσεται προς αδενωμάτωση, παρατηρείται ομότιμη και σταθερά μειωμένη λειτουργία της πρωτεΐνης APC (λόγω μετάλλαξης του *APC*) **σε όλο το μήκος του άξονα της κρύπτης**. Η μετάλλαξη *APC* από μόνη της δεν είναι ικανή να προκαλέσει την απόλυτη πλήρωση της εσοχής και τη μονοκλωνική μετατροπή της κρύπτης⁵⁴. Παρόλα αυτά, η μετάλλαξη *APC* διαταράσσει την ομοιοστάση της κολονικής κρύπτης : έχει βρεθεί ότι η αποσιώπηση της APC πρωτεΐνης επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό στο κόλον, ενώ η επανέκφρασή της σε φυσιολογικά επίπεδα τον αποκαθιστά⁶¹. Ως αποτέλεσμα της ελλιπούς λειτουργίας της πρωτεΐνης APC, η Wnt σηματοδότηση πυροδοτείται - λόγω αναστολής της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης- και η β-κατενίνη σταθεροποιείται. Αμφότερες οι επιδράσεις αυτές συμβαίνουν στον ίδιο μεγάλο βαθμό σε όλο το μήκος της κρύπτης, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της β-κατενίνης να παραμένουν το ίδιο υψηλά και η λειτουργία της να διατηρείται το ίδιο ενεργή τόσο στην περιοχή της κρύπτης όσο και στη λαχνωτή περιοχή (ισότιμη ON-state της β-κατενίνης σε όλο το μήκος της κολονικής κρύπτης, εικόνα 10, δεξιό τμήμα)⁵⁹.

Στο ανώτερο, λαχνωτό τμήμα της κρύπτης οι απόγονοι των μεταλλαγμένων *APC* mt/mt προγονικών κυττάρων (ωριμάζοντα κύτταρα, t-a cells) παγιδεύονται, λόγω σημαντικού περιορισμού της ικανότητας μετανάστευσής τους³⁶. Τα αυξημένα επίπεδα της β-κατενίνης βοηθούν αυτά τα παγιδευμένα, μεταλλαγμένα κύτταρα αφενός να διατηρήσουν ένα προγονικό φαινότυπο, αφετέρου να συντηρήσουν τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό, εφόσον το σύμπλοκο [TCF-β-κατενίνη] οδηγεί στην μερική αντικατάσταση του κυτταρικού προγράμματος του διαφοροποιημένου κυττάρου με αυτό του πολλαπλασιαζόμενου προγονικού κυττάρου. Ο μεσολαβητής αυτών των επιδράσεων είναι το ογκογονίδιο c-myc, το οποίο καταστέλλει τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF1/Cip1}⁶².

Κατά συνέπεια, εντός αυτών των *APC* mt/mt κυττάρων ο κυτταρικός κύκλος διατηρείται ενεργός, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ενισχύεται (εικόνες 10-12, 14 και 15), η απόπτωση καταστέλλεται, η διαφοροποίηση σταματά και η μετανάστευση προς τον κολονικό αυλό αναστέλλεται⁵³. Με τον τρόπο αυτό, συναθροίσεις κυττάρων που φέρουν τον φαινότυπο των προγονικών κυττάρων (aberrant cells) αθροίζονται στο άνω τμήμα της κρύπτης και σχηματίζουν μία ανώμαλη κρύπτη (aberrant crypt), στο σημείο όπου θα σχηματισθεί ο μελλοντικός πολύποδας (εικόνα 10, δεξιό τμήμα)⁵⁹.

Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία εστιών από ανώμαλες κρύπτες (ανώμαλες κρυπτικές εστίες, aberrant crypt foci - ACF), όρος συνώνυμος με το μικροαδένωμα⁶³. Ο όρος αυτός είναι στην πράξη ενδοσκοπικός : οι ανώμαλες κρυπτικές εστίες ορίζονται ως οι μικροσκοπικές αθροίσεις μικρού αριθμού ανώμαλων ή τροποποιημένων κρυπτών σε ένα βλεννογόνο παχέος εντέρου ή ορθού που δεν είναι εμβυθισμένος και οι οποίες ανιχνεύονται *in vivo* με τη βοήθεια χρωστικής και με μεγεθυντικό ενδοσκόπιο⁶⁵. Στην πλειονότητά τους οι ενδοσκοπικά ACF είναι ιστολογικά φυσιολογικές, αλλά μπορεί να αναπαριστούν πραγματικές υπερπλαστικές ή δυσπλαστικές κρύπτες⁶⁴.

Μολονότι η ογκογόνος δυναμική των ACF είναι αβέβαιη^{53,55,56, 63,64}, αυτές θεωρούνται ως οι πλέον πρώιμες αλλοιώσεις στη διαδικασία της ορθοκολικής καρκινογένεσης. Η κρατούσα θέση είναι ότι οι ACF προηγούνται του αδενώματος^{39,53,63}. Οι δυσπλαστικές ACF είναι αυτές που τελικά θα μετατραπούν σε αδενώματα^{39, 53, 63} και αντιστοιχούν στις πλέον πρώιμες αλλοιώσεις των γονοτύπων 3β, 4 και 5⁵⁰. Αντιθέτως, οι υπερπλαστικές ACF είναι αυτές που τελικά θα οδηγήσουν σε οδοντωτούς πολύποδες και αντιστοιχούν στις πλέον πρώιμες αλλοιώσεις των γονοτύπων 1,2 και 3α^{50, 63}. Αμφότερες οι υπερπλαστικές και οι δυσπλαστικές ανώμαλες κρυπτικές εστίες είναι μονοκλωνικές δομές⁵⁴.

Εν τέλει, η συνακόλουθη επίδραση διαφόρων μεταλλάξεων, αποτέλεσμα της επίδρασης των σημάτων που παράγονται από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος, οδηγεί τις γειτονικές ανώμαλες κρύπτες (που συναποτελούν τις ACF) προς διάφορες κατευθύνσεις, διακριτές μεταξύ τους. Ο κλώνος που τελικά επικρατεί σε κάθε κρύπτη είναι ξεχωριστός και διαφορετικός μεταξύ των γειτονικών κρυπτών, και κατά συνέπεια, το αδένωμα που προκύπτει από τις ACF είναι πολυκλωνικό⁵⁴.

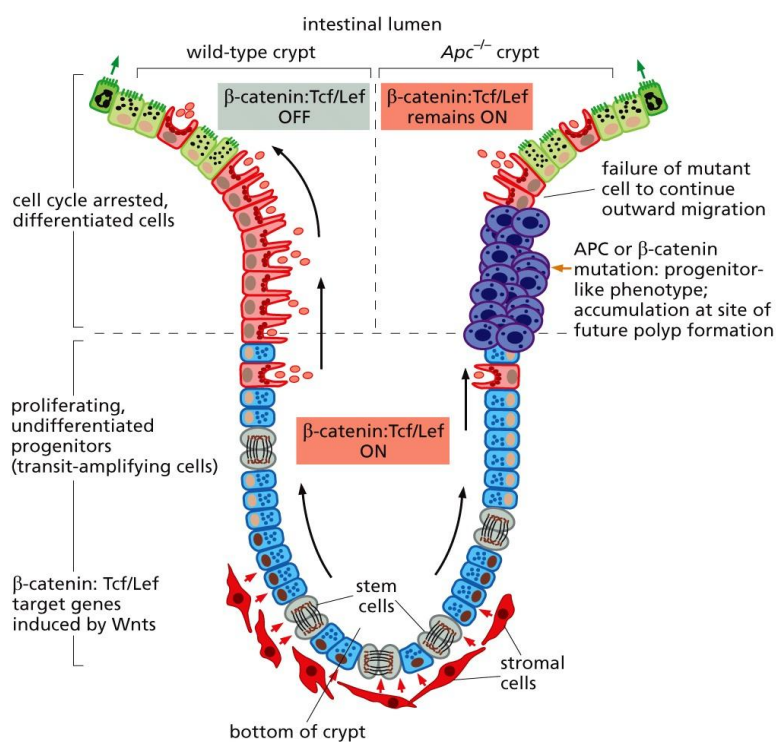
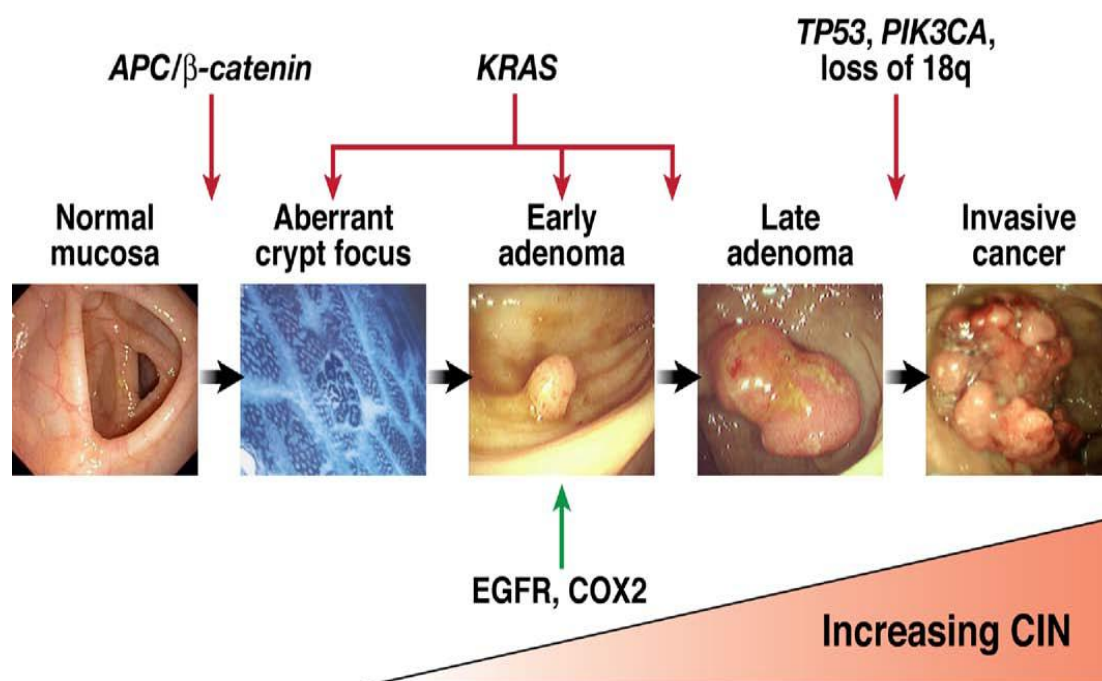


Figure 7.24b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Εικόνα 10: Η βιολογία των φυσιολογικών (αριστερά) και των δυσπλαστικών (δεξιά) κολονικών κρυπτών (από αναφορά 59).

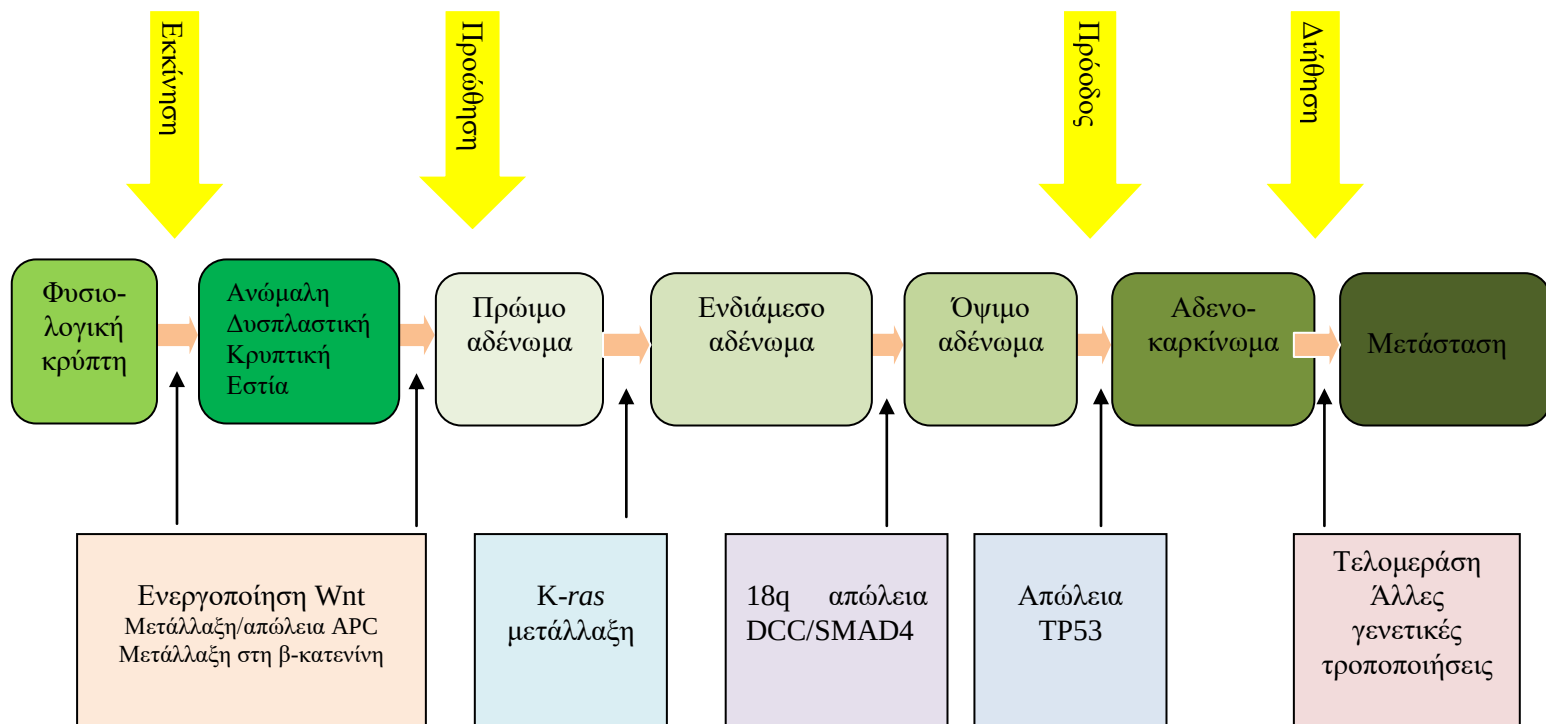
6. Οι αλληλουχίες από το φυσιολογικό βλεννογόνο προς τον ορθοκολικό καρκίνο και ο ρόλος του APC

Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού πρωτοπεριγράφηκε τη διετία 1988-1990 από τους Vogelstein και Fearon^{27, 67} και έκτοτε επιβεβαιώθηκε από πολλούς άλλους ερευνητές^{28,31,36,39,41,48,52}. Συνοπτικά, προτάθηκε ένα γενετικό πρότυπο για την ορθοκολική καρκινογένεση, στο οποίο το νεόπλασμα έχει κλωνική φύση και πολυσταδιακή βάση. Στο πρότυπο αυτό η αλληλουχία των ιστικών αλλοιώσεων περιλαμβάνει το φυσιολογικό βλεννογόνο, την ανώμαλη δυσπλαστική κρυπτική εστία (ACF), το αδένωμα με τη χαμηλόβαθμη δυσπλασία, το αδένωμα με την υψηλόβαθμη δυσπλασία και τον καρκίνο. Η διαδοχή αυτή απεικονίζεται στις εικόνες 3 και 11. Απαντάται στο 75-80 % των περιπτώσεων ΚΠΕΟ²⁸ και περίπου στο 70-80% των περιπτώσεων σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης^{37, 52, 66}. Συνιστά, ως ανεφέρθη, τη διαδρομή που ακολουθεί η ιστική μεταμόρφωση στους γονοτύπους 3β, 4 και 5.



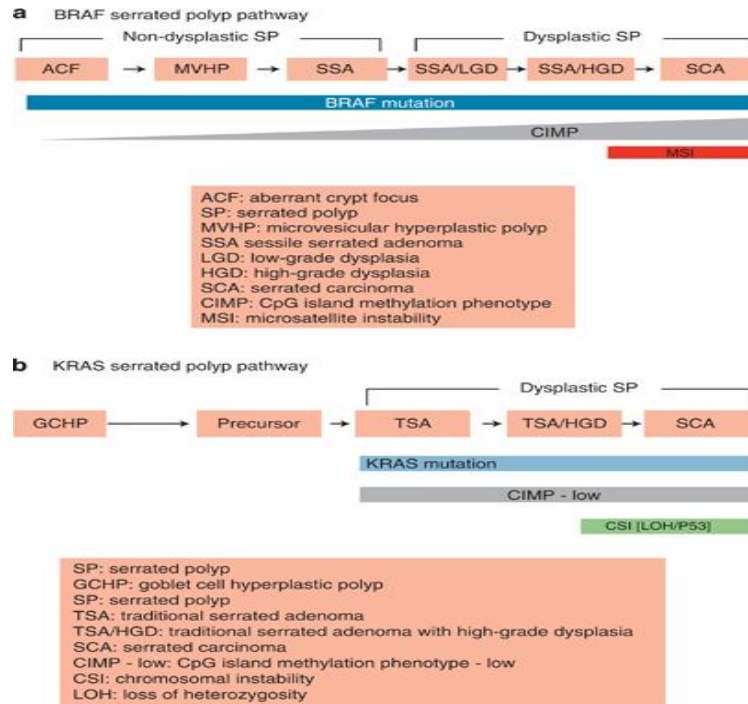
Εικόνα 11 : Το πολυσταδιακό γενετικό πρότυπο της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο ή η αλληλουχία αδενώματος-καρκινώματος (από αναφορά 39).

Η σημασία του προτύπου έγκειτο στο γεγονός ότι απέδειξε ότι συγκεκριμένα γενετικά συμβάντα μπορούν να έχουν ως συνέπεια μορφολογικές ιστικές αλλαγές στο κόλον και ότι η μεταμόρφωση του φυσιολογικού σε καρκινικό ιστό διέρχεται υποχρεωτικά από ένα ενδιάμεσο καλόηθες στάδιο (καλόηθες νεόπλασμα ή αδένωμα ή πολύποδας), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα επί του οποίου θα αναπτυχθεί ο καρκίνος. Αυτή η διαδοχή των γεγονότων (μοριακών, ιστοπαθολογικών) συνιστά την **κλασική αλληλουχία αδενώματος-καρκινώματος (adenoma-carcinoma sequence)**. Η αλληλουχία αυτή απετέλεσε τη βάση της μοριακής έρευνας του καρκίνου τόσο στο παχύ έντερο και το ορθό²⁴ όσο και σε άλλα όργανα στα χρόνια που μεσολάβησαν (εικόνα 12).



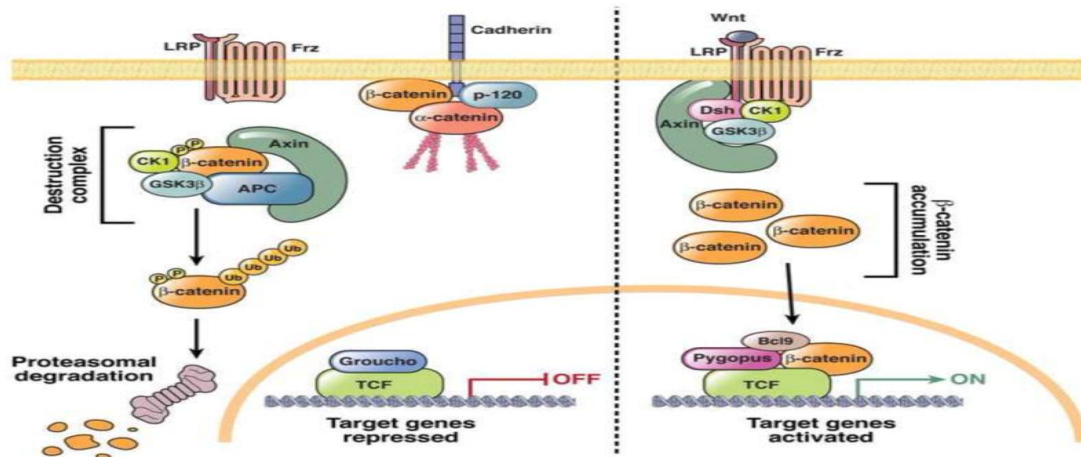
Εικόνα 12 : Το αποδεκτό πρότυπο ανάπτυξης του ορθοκολικού καρκίνου : η αλληλουχία αδενώματος-καρκινώματος. Η διαδικασία της ορθοκολικής ογκογένεσης είναι ένα συνεχές. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού είναι το αποτέλεσμα της βαθμιαίας άθροισης πολλαπλών, επιλεγμένων κλωνικά, σωματικών μεταλλάξεων, οι οποίες εξαναγκάζουν τις φυσιολογικές κρύπτες να μεταμορφωθούν σε δυσπλαστικό επιθήλιο και ακολούθως σε καρκίνωμα. Η ενεργοποίηση της οδού Wnt (απενεργοποίηση του APC ή μετάλλαξη στη β-κατενίνη) συμβαίνει *συνήθως* σε αρχικό στάδιο, συνεισφέροντας στην εκκίνηση (initiation) της νεοπλασματικής διαδικασίας, ενώ η μετάλλαξη στο K-ras συμβαίνει *συνήθως* σε πρώιμο στάδιο, συμβάλλοντας στην πρόωθηση (promotion) της ογκογόνου διαδικασίας. Αυτή η σειρά των γεγονότων ισχύει στο 70-80% των περιπτώσεων σποραδικού ορθοκολικού καρκίνου (βασισμένο στις αναφορές 52, 27, 30, 31, 34, 39, 63, 66 και 67).

Σύντομα τεκμηριώθηκε και μία εναλλακτική αλληλουχία ορθοκολικής καρκινογένεσης, η οποία καταλήγει στο σχηματισμό οδοντωτών καρκινωμάτων, η αλληλουχία της οδοντωτής καρκινογένεσης⁵⁸. Η αλληλουχία αυτή αντιστοιχεί στο 20-25% του συνόλου των ορθοκολικών καρκίνων και στο 20-30% των περιπτώσεων σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης^{28,37,50,52}. Κατ' αναλογία, δύναται να ονομασθεί αλληλουχία οδοντωτού αδενώματος-καρκινώματος. Συνιστά τη διαδρομή που ακολουθεί η ιστική μεταμόρφωση στους γονότυπους 1,2 και 3α. Η αρχή που ακολουθεί η αλληλουχία αυτή είναι ίδια με την κλασική : ξεκινά από τον φυσιολογικό βλεννογόνο και καταλήγει στον καρκίνο και η μετάβαση από το ένα στάδιο στο επόμενο καθοδηγείται από σε συγκεκριμένη κυρίαρχη μετάλλαξη και οφείλεται σε αυτή. Επίσης υπάρχουν συγκεκριμένα ενδιάμεσα καλοήγη ιστολογικά στάδια, από τα οποία υποχρεωτικά διέρχεται ο ορθοκολικός ιστός, τα οποία συνοπτικά είναι οι υπερπλαστικές κρυπτικές εστίες (ACF), οι οδοντωτές αλλοιώσεις (υπερπλαστικοί πολύποδες, παραδοσιακά οδοντωτά αδενώματα, άμισχα οδοντωτά αδενώματα), οι οδοντωτές αλλοιώσεις με υψηλόβαθμη δυσπλασία και ο καρκίνος^{50, 37, 125}. Στη διαδοχή αυτή η γενετική αλλοίωση που διαδραματίζει το σημαντικότερο ρόλο είναι στους μεν γονότυπους 1 και 2 η μετάλλαξη BRAF (εικόνα 13a), στο δε γονότυπο 3α η μετάλλαξη K-ras (εικόνα 13b).



Εικόνα 13 : Η αλληλουχία του οδοντωτού αδενώματος-καρκινώματος στο κόλον, ανάλογα με τον τύπο της κυρίαρχης μετάλλαξης (από αναφορά 66).

Όπως γίνεται σαφές από τις προαναφερθείσες αλληλουχίες, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC διαδραματίζει εμφανώς πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη κυρίως της κλασικής ορθοκολικής καρκινογένεσης. Όμως έχει παρατηρηθεί ότι, ακόμα και στη συντριπτική πλειοψηφία⁶⁸ - κατ' άλλους στο σύνολο⁶⁹ - των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου με φυσιολογικό APC (όπως συμβαίνει στη μεγάλη πλειονότητα των οδοντωτών νεοπλασμάτων⁴¹), ανιχνεύονται ισοδύναμες μεταλλάξεις, οι οποίες υπερενεργοποιούν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/APC/β-κατενίνη³⁰.



Εικόνα 14 : Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/APC/β-κατενίνη σε καταστάσεις αδράνειας (αριστερά) και ενεργοποίησης (δεξιά) (από αναφορά 39).

Το γονίδιο APC μεταλλάσσεται ομόζυγα στο 70-80% των περιπτώσεων σποραδικών ορθοκολικών αδενωμάτων^{30,54, 66} και στο 80-85 % περίπου των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου^{66,68}. Συνολικά το μονοπάτι Wnt υπερδραστηριοποιείται στο 80-90 % των σποραδικών ΚΠΕΟ^{41,61,71} και στο 90-100% του συνόλου των ΚΠΕΟ^{39,61,70}. Η κριτικής

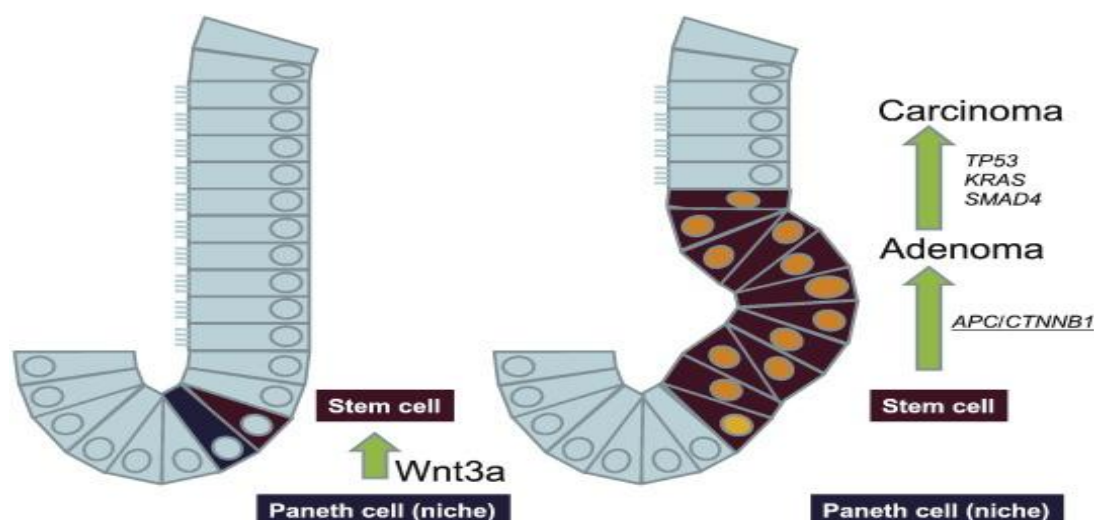
σημασίας συνεισφορά της APC μετάλλαξης στο σύνολο των σταδίων της ορθοκολικής καρκινογένεσης είναι επαρκώς τεκμηριωμένη.

Σε ιστολογικό επίπεδο, η APC μετάλλαξη συμβάλλει στη δημιουργία του μονοκρυπτικού αδενώματος, του μικροαδενώματος και του πρώιμου αδενώματος^{54-56,70}. Η απώλεια του ενός ή και των δύο αλληλίων του APC, η αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης της APC και η άθροιση των μορίων της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα έχει ανιχνευθεί στο άνω μέρος των κρυπτών του φυσιολογικού ορθοκολικού βλεννογόνου ατόμων με σποραδικά ορθοκολικά αδενώματα⁷². Η μετάλλαξη είναι παρούσα ακόμα και σε αλλοιώσεις με λίγες δυσπλαστικές κρύπτες (ACF, μικροσκοπικά αδενώματα)^{39,63}. Η συχνότητα της APC μετάλλαξης δεν διαφέρει μεταξύ αδενωμάτων, πρώιμων και όψιμων καρκινωμάτων^{30,61}. Τέλος, έχει βρεθεί ότι τόσο τα πρώιμα όσο και τα όψιμα ορθοκολικά καρκινώματα εξαρτώνται από τη συνεχή και αδιάκοπη υπερενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού³⁰.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η μετάλλαξη του APC, η απενεργοποίηση του APC, ή η ισοδύναμη μετάλλαξη δρουν, εφόσον υπάρχουν, σε πρώιμο στάδιο της ογκογένεσης^{30,52,68,70,72}. Η μετάλλαξη APC δρα στα αρχέγονα κύτταρα στην εσοχή της κρύπτης, συμβάλλοντας στη μετατροπή τους σε αρχέγονα καρκινικά κύτταρα (cancer stem cells) και σε διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα^{41, 72} (εικόνες 7, 10 και 15). Η APC μετάλλαξη οδηγεί σε συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό, περιορισμό της απόπτωσης, μείωση της διαφοροποίησης, ενώ παράλληλα αυξάνει την κυτταρική μετανάστευση και την προσκόλληση^{59,40,68,70-72}.

Σε μοριακό επίπεδο, η δράση της μετάλλαξης APC οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στην σταθεροποίηση της ελεύθερης κυτταροπλασματικής β-κατενίνης, με αποτέλεσμα τη μεταφορά της β-κατενίνης στον πυρήνα, τη σύνδεσή της με τον T-cell factor (TCF), την επαγωγή της μεταγραφής και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και, κατά συνέπεια, στην επιτάχυνση της ογκογόνου διαδικασίας (εικόνα 14-δεξιό τμήμα, εικόνες 14 και 16)^{39,40,59,68}.

Για τους προαναφερθέντες λόγους η μετάλλαξη APC θεωρείται παραδοσιακά μία γενετική αλλοίωση με κραταιό και κυρίαρχο ρόλο στην ορθοκολική καρκινογένεση. Η APC μετάλλαξη συνιστά τη **βασικότερη gatekeeper μετάλλαξη** στην ορθοκολική καρκινογένεση και από τους περισσότερους ερευνητές είναι παραδεκτό, ότι όταν η APC μετάλλαξη είναι παρούσα, είναι η πρωιμότερη μετάλλαξη και ο εκκινητής της διαδικασίας της ορθοκολικής ογκογένεσης (εικόνες 4, 11, 12 και 15)^{40,69}.



Εικόνα 15 : Η συμβολή της πρώιμης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στην εκκίνηση της ορθοκολικής καρκινογένεσης (από αναφορά 70).

7. Υπάρχουν αναπάντητα ερωτήματα ή ενστάσεις σχετικά με το αποδεκτό πρότυπο ορθοκολικής καρκινογένεσης ;

Το πρώτο ερώτημα που αναδύεται αφορά στη σκοτεινή φύση της πρώιμης απενεργοποίησης του APC. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressors, ts-genes) υπερέχουν των ογκογονιδίων στον ορθοκολικό καρκίνο ²¹. Η απενεργοποίησή τους είναι, συνεπώς, απαραίτητη για την έναρξη (initiation), την προώθηση (promotion) και την πρόοδο (progression) της διαδικασίας. Η απενεργοποίηση των ts-genes στην πράξη οφείλεται : i) σε απώλεια/απενεργοποίηση των αλληλίων (απώλεια της ετεροζυγωτίας - LOH) και/ή ii) σε σημειακή μετάλλαξη. Στην πρώτη περίπτωση, η απώλεια των αλληλίων προϋποθέτει θραύσεις της διπλής έλικας του DNA (DSBs : DNA double strand breaks), προκειμένου οι τελευταίες να διευκολύνουν τις γενωμικές ανακατατάξεις, οι οποίες τελικά οδηγούν σε απώλεια γενωμικών ή χρωμοσωμικών τμημάτων. Οι DSBs στο γονιδίωμα μπορούν να συμβούν αποκλειστικά κάτω από την επίδραση του επαγόμενου από ογκογονίδιο αντιγραφικού stress (oncogene-induced replication stress). Στη δεύτερη περίπτωση, οι υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων μπορούν να ανακύψουν είτε από εξωγενείς είτε από ενδογενείς παράγοντες, με συχνότερους τους τελευταίους, οι οποίοι έχουν ως κύρια γενεσιουργό αιτία την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS : reactive oxygen species), λόγω μεταβολικού stress. Τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια είναι υπεύθυνα και πάλι για την παραγωγή ROS ⁷³⁻⁷⁵.

Παρόλο που γνωρίζουμε ότι η απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου αρκεί για να εκκινήσει την ορθοκολική καρκινογένεση, η βαθύτερη αιτία αυτής της απενεργοποίησης δεν μας είναι σαφής. Σύμφωνα με τα δεδομένα που μόλις αναφέρθηκαν, δεν γνωρίζουμε ποιο ογκογονίδιο θα μπορούσε να είναι υπεύθυνο γι' αυτή τη γενετική εκτροπή. Αυτό το ογκογονίδιο θα ενεργοποιείτο προφανώς πριν τις αλλοιώσεις στο APC, δηλαδή σε πολύ πρώιμα στάδια της ορθοκολικής καρκινογένεσης. Επιπλέον ερωτήματα που ανακύπτουν είναι : ποια είναι η φύση του ή των γεγονότων που προκαλούν την ετεροζυγωτία στο APC ; Ποια είναι η μηχανιστική βάση μιας τόσο πρώιμης απενεργοποίησης στο APC ;

Δεύτερο, η διαλληλική απώλεια του APC δεν είναι αναγκαία για την διαδικασία της καρκινογένεσης σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών με ΚΠΕΟ. Όπως ήδη αναφέρθηκε, στους γονότυπους 1 και 2 το APC είναι φυσιολογικό, σε αντίθεση με τους γονότυπους 3 και 4 στους οποίους η μετάλλαξη APC είναι χαρακτηριστική ⁴¹. Στο 20 % περίπου των ορθοκολικών νεοπλασμάτων το APC δεν είναι μεταλλαγμένο ^{30,54,66,68}. Οι μισοί μόνο από τους υπερμεταλλαγμένους ορθοκολικούς καρκίνους και το 80% των μη-υπερμεταλλαγμένων ορθοκολικών φέρουν τη μετάλλαξη ³². Επιπλέον, πειραματικές ενδείξεις σε ποντίκια έδειξαν ότι η ορθοκολική καρκινογένεση μπορεί να ξεκινήσει παρά την απουσία μετάλλαξης στο APC ⁶³ ή στη β-κατενίνη ⁷⁶.

Τρίτο, όπως οι Fearon και Vogelstein είχαν καταστήσει σαφές κατά την αρχική αποκάλυψη του μοντέλου τους, περισσότερο η προοδευτική άθροιση και πολύ λιγότερο η σειρά των γενετικών αλλαγών έχει καθοριστική σημασία για την πρόοδο του ορθοκολικού καρκίνου. Συγκεκριμένα είχαν αποδείξει ότι η απώλεια του 5q (σε αυτό τον χρωμοσωμικό τόπο εδράζεται το γονίδιο APC) δεν ήταν συνώνυμη με το πολύ αρχικό στάδιο της ογκογένεσης. Είχαν μάλιστα υποθέσει ότι η μετάπτωση από τον υπερπλαστικό στο νεοπλασματικό ορθοκολικό βλεννογόνο πιθανόν να μην επάγεται από την απώλεια ή τη μετάλλαξη του δευτέρου APC αλληλίου ²⁷. Επέτρεψαν επομένως σε μελλοντικούς ερευνητές να διερευνήσουν για πιθανά εναλλακτικά γεγονότα, διαφορετικά από τη μετάλλαξη APC, που θα ήταν δυνητικά υπεύθυνα για την εκκίνηση της ορθοκολικής καρκινογένεσης.

Τέταρτο, το θεμελιώδες πρωτότυπο μοντέλο ^{27,52} της αλληλουχίας αδενώματος-καρκινώματος είναι έγκυρο μόνο για το 70-80% των περιπτώσεων σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης, όπως ήδη αναφέρθηκε ^{37,50, 52,66}.

Πέμπτο, όπως είχε ήδη αναφέρει ο Vogelstein στην αρχική του ανακοίνωση για την πολυσταδιακή φύση της ορθοκολικής καρκινογένεσης ⁶⁷ αλλά και περιορισμένος αριθμός ερευνητών κατά τη δεκαετία που ακολούθησε ^{77,78}, η επίπτωση της απώλειας της ετεροζυγωτίας του APC στα σποραδικά ορθοκολικά αδενώματα και καρκινώματα ενδέχεται να είναι στην πραγματικότητα μικρότερη από αυτή που πιστεύουμε, κυμαινόμενη πιθανόν από 20% έως 63%. Παρά το γεγονός ότι σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ορθοκολικού καρκίνου με φυσιολογικό APC λειτουργικά ισοδύναμες με την απώλεια του APC μεταλλάξεις είναι παρούσες, οι οποίες και εκκινούν την καρκινογένεση, οι πιθανότητες να ολοκληρωθεί η διαδικασία και να προκύψει καρκίνος είναι σημαντικά μικρότερες όταν το APC είναι φυσιολογικό παρά όταν είναι μεταλλαγμένο ⁶⁹. Σε τέτοιες περιπτώσεις δύο ζητήματα πρέπει να φωτισθούν : ποια είναι τα εναλλακτικά γεγονότα που υπερενεργοποιούν το μονοπάτι Wnt; Ποιες μεταλλάξεις λειτουργούν ως gatekeeper στη διαδικασία της ορθοκολικής ογκογένεσης;

Έκτο, απεδείχθη πειραματικά, ότι τουλάχιστον σε μερικές υποπεριπτώσεις ΚΠΕΟ, η χρωμοσωμική αστάθεια μπορεί να προηγείται της απώλειας του APC ⁶³. Ομοίως, απεδείχθη ότι οι αλλαγές στη διαμόρφωση της χρωματίνης κατά μήκος του άξονα της κρύπτης ήταν αυτές που τροποποιούσαν την έκφραση του APC και όχι το αντίθετο ⁵³. Κατέστη επομένως προφανές ότι δεν είναι η απώλεια του APC υπεύθυνη για την απόκτηση της γενωμικής αστάθειας, αλλά ένα διαφορετικό γενετικό γεγονός.

Τελευταίο, και εξίσου σημαντικό, οι δυσπλαστικές ανώμαλες κρυπτικές εστίες (ACF), οι οποίες, ως εικάζεται, είναι οι πρόδρομες αλλοιώσεις των αδενωμάτων ^{39,53,63,79}, έχουν απώλεια του APC σε πολύ μικρό ποσοστό (0-6%) στους ασθενείς που δεν πάσχουν από FAP (οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση), ενώ, αντιθέτως, το APC λείπει σε όλες τις ACF των ασθενών με FAP ⁶³. Αντιθέτως, οι μεταλλάξεις K-ras ανιχνεύονται στο 50-67 % των δυσπλαστικών ACFs ^{63,79} και στο 82 % των μη δυσπλαστικών ACFs ⁶³. Κατά συνέπεια προτάθηκε ^{39,53,63,79} ότι σε περιπτώσεις ορθοκολικής καρκινογένεσης χωρίς ιστορικό FAP, που είναι και η πλειοψηφία των ασθενών που ακολουθούν το κλασικό μοντέλο αδενώματος-καρκινώματος, η μετάλλαξη K-ras θα ήταν λογικό να προηγείται της μετάλλαξης APC. Ως εκ τούτου, η μετάλλαξη στο K-ras θα μπορούσε δυνητικά να αντιπροσωπεύει το γενετικό γεγονός, το υπεύθυνο για την έναρξη υποσυνόλου περιπτώσεων της διαδικασίας ορθοκολικής καρκινογένεσης ^{54,63}.

8. Η αλληλεπίδραση και η αλληλεξάρτηση των κύριων ογκογόνων μονοπατιών (Wnt και MAPK) της ορθοκολικής καρκινογένεσης

Η πρόοδος προς τον ορθοκολικό καρκίνο προϋποθέτει στις περισσότερες περιπτώσεις αμφότερες τις μεταλλάξεις, τόσο του APC όσο και του K-ras. Αν και όλα τα μοντέλα διαδοχής των γενετικών αλλοιώσεων παρουσιάζουν τις μεταλλάξεις αυτές να λαμβάνουν χώρα σε διακριτές χρονικές στιγμές^{25,30,31,35,39,40,48,50,59,70,79,80} υπαινισσόμενα την ανεξαρτησία μεταξύ τους, οι μεταλλάξεις αυτές δεν είναι απόλυτα ανεξάρτητες. Η αλληλεπίδραση των μεταλλάξεων APC και K-ras στην ορθοκολική καρκινογένεση είναι φτωχά κατανοητή και εξαιρετικά περίπλοκη. Πρώιμες αναφορές είχαν δείξει μία συνεργική επίδραση ανάμεσα στο μονοπάτι Wnt (που συμπεριλαμβάνει την πρωτεΐνη APC) και αυτού των MAP κινασών (που συμπεριλαμβάνει την πρωτεΐνη RAS)⁷⁶, η οποία επιβεβαιώθηκε από πρόσφατες μελέτες⁸¹.

Η συνεργασία μεταξύ των δύο μεταλλάξεων στην πλήρη ενεργοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και στην κλωνική επέκταση του πληθυσμού τους είναι τεκμηριωμένη⁸¹. Η μονοαλληλική μετάλλαξη στο APC συνεισφέρει στην ήπια ενεργοποίηση των αρχέγονων κυττάρων στη βάση των κρυπτών (ασθενής σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt) και στη μετανάστευσή τους στη μεταβατική ζώνη. Στα APC mt/wt ωριμάζοντα κύτταρα (t-a cells), η προσθήκη της μετάλλαξης K-ras ενισχύει τη σηματοδότηση Wnt⁸².

Φαίνεται επιπλέον ότι το κάθε ένα από τα δύο κύρια ογκογόνα μονοπάτια εξαρτά την πλήρη δραστηριότητά του από το άλλο. Το φυσιολογικό γονίδιο APC μπορεί να καταστείλει την ογκογένεση που επάγεται από το ογκογονίδιο K-ras⁸⁷, ενώ η ομόζυγη απώλεια ή η ομόζυγη μετάλλαξη στο APC σταθεροποιεί την ογκογόνο RAS πρωτεΐνη (GTP-RAS), μεγιστοποιώντας τη δράση της⁴⁵. Αυτή η επίδραση είναι ευρύτερη · έχειδειχθεί η αναστολή της αποδόμησης της ογκογόνου μορφής της RAS πρωτεΐνης από άλλα μακρομόρια του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης, εκτός από την APC⁸⁸. Φαίνεται, επομένως, ότι η δραστηριότητα των μορίων του μονοπατιού των MAP κινασών (συμπεριλαμβανομένης της RAS πρωτεΐνης) καταστέλλεται (αρνητική ρύθμιση) από τη λειτουργία της φυσιολογικής APC πρωτεΐνης. Αντιθέτως, ενισχύεται (θετική ρύθμιση) από τη μετάλλαξη APC ή από την αφθονία των Wnt σηματοδοτικών σημάτων, γεγονός που επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση της β-κατενίνης^{88,89}. Έτσι, η ογκογόνος K-RAS πρωτεΐνη προσαρμόζει τη δράση της επί προϋπάρχουσας υπερενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/APC/β-κατενίνη. Γενικότερα, το μονοπάτι των MAP κινασών απαιτεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt.

Ισχύει και το αντίστροφο : η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt απαιτεί τη δράση ενδιάμεσων μεσολαβητών του μονοπατιού των MAP κινασών. Έχειδειχθεί, ότι εάν απουσιάζουν συνυπάρχουσες γενετικές τροποποιήσεις, η APC μετάλλαξη δεν επαρκεί για να ξεκινήσει την καρκινογένεση⁴⁵. Η μετάλλαξη στο K-ras ενισχύει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt, συνεισφέροντας στη «βλαστικότητα» και στην υπερακόντιση της ενεργοποίησης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων : απεδείχθη ότι η πειραματικά επαγόμενη έκφραση της μετάλλαξης K-ras στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του κόλου αύξησε την έκφραση των γονιδίων-στόχων του Wnt μονοπατιού και την πυρηνική μετατόπιση της β-κατενίνης⁹⁰, ενώ η πειραματική δέσμευση του υποδοχέα EGFR είχε ακριβώς τις αντίθετες επιδράσεις⁸³. Πειραματικά, βρέθηκε ότι η Wnt δραστηριότητα ρυθμίζεται και εξαρτάται από τη σηματοδότηση του μονοπατιού των MAP κινασών⁴⁵ : στο ψάρι ζέμπρα αποδείχθηκε ότι η ομόζυγη απώλεια του APC είναι ανεπαρκής να οδηγήσει τις συναθροίσεις β-κατενίνης στον πυρήνα, μετατόπιση που απαιτούσε την προσθήκη της μετάλλαξης K-ras για να πραγματοποιηθεί⁸⁹.

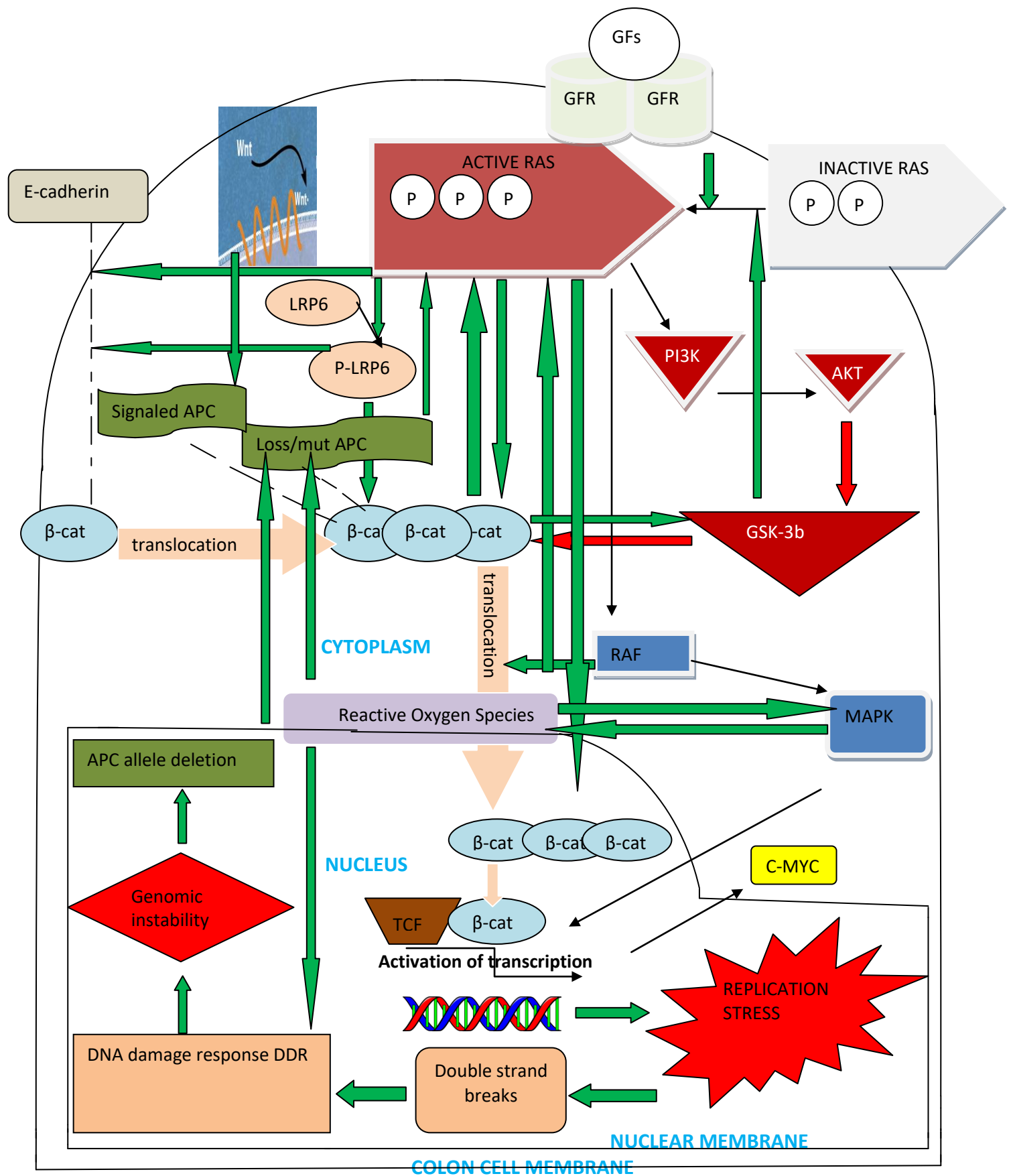
Προς επίρρωση της τελευταίας παρατήρησης, έχειδειχθεί ότι τόσο η επίτευξη της LOH στο APC όσο και το ογκογόνο αποτέλεσμα της ομόζυγης APC μετάλλαξης εξαρτώνται σε

μεγάλο βαθμό από την K-ras μετάλλαξη. Η K-ras μετάλλαξη από μόνη της προάγει διάσπαρτη υπερπλασία του κολονικού επιθηλίου ⁸⁴. Αυτή η υπερπλασία ενδέχεται να προδιαθέτει σε απώλεια της ετεροζυγωτίας του APC (LOH). Πράγματι, η K-ras μετάλλαξη εκφράζεται και ανιχνεύεται στο άνω μέρος των κρυπτών, όπου και λαμβάνει χώρα η APC LOH ⁸⁵. Επί εδάφους διαλλαχτικής απώλειας στο APC, η μετάλλαξη K-ras θέτει ένα επιπλέον εμπόδιο στα APC mt/mt ωριμάζοντα μεταναστεύοντα κύτταρα να αποδιαφοροποιηθούν, μετατρέποντάς τα τελικά σε διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα ⁸⁵ (εικόνα 7).

Η β-κατενίνη αναδεικνύεται τελικά το μόριο-κλειδί, που συνδέει τα δύο μονοπάτια. Βρέθηκε ότι ο πολλαπλασιασμός των κολονικών κυττάρων που μεσολαβείται από τη μετάλλαξη K-ras μετά την απώλεια του APC απαιτεί την ταυτόχρονη παρουσία της β-κατενίνης ^{89,90}. Στην πράξη τεκμηριώθηκε συσχέτιση μεταξύ της πυρηνικής παρουσίας της β-κατενίνης και της μετάλλαξης K-ras ⁸³. Η ενίσχυση της δράσης της β-κατενίνης από τη μετάλλαξη K-ras εκτοξεύεται από τρεις επιδράσεις : 1^ο, η μετάλλαξη K-ras αυξάνει την τυροσινική φωσφορυλίωση της β-κατενίνης με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της από την E-καντερίνη στην κυτταρική μεμβράνη και τη διεύρυνση της κυτταροπλασματικής δεξαμενής της β-κατενίνης ⁸² 2^ο, η μετάλλαξη K-ras αυξάνει την πυρηνική μετατόπιση της β-κατενίνης με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης Raf ⁹⁰ και 3^ο, η μετάλλαξη K-ras αυξάνει το σχηματισμό των πυρηνικών συμπλόκων β-κατενίνης/TCF ⁹¹. Έτσι, τεκμηριώθηκε ότι η ογκογόνος δράση της μεταλλαγμένης K-RAS πρωτεΐνης στο κολονικό επιθήλιο δεν ασκείται μόνο μέσω των MAP κινασών και τους μεσολαβητές αυτών, αλλά και μέσω της β-κατενίνης.

Μεταξύ των δύο βασικών μονοπατιών έχουν βρεθεί ολιγάριθμοι σύνδεσμοι. Πρώτον, η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK-3β) αναστέλλεται από τη μεταλλαγμένη K-RAS μέσω του μονοπατιού PI3K και της ενεργοποίησης του AKT ⁹². Παράλληλα, η αναστολή της GSK-3β σταθεροποιεί τη β-κατενίνη, επειδή καθιστά το σύμπλοκο της APC με τη GSK-3β ανενεργό (εικόνα 14, αριστερό τμήμα), δράση που διενεργείται μόνο εάν η Wnt σηματοδότηση είναι ενεργή ⁹¹. Τα αυξημένα επίπεδα της β-κατενίνης, λόγω σταθεροποίησής της και λόγω πληθώρας Wnt σημάτων, ρυθμίζουν θετικά τη GSK-3β, η οποία οδηγεί στη συνέχεια σε φωσφορυλίωση και σταθεροποίηση της πρωτεΐνης RAS στην ενεργό κατάσταση RAS-GTP (εγκατάσταση φαύλου κύκλου) ⁸⁸. Καθίσταται έτσι εμφανές ότι η υπερενεργοποίηση του Wnt ασκεί την ογκογόνο δράση της όχι μόνο μέσω της δράσης της β-κατενίνης στον πυρήνα, αλλά και μέσω της ενίσχυσης του καταρράκτη που επάγει η RAS-GTP. Δεύτερον, η LRP6 φωσφορυλιώνεται από την σηματοδότηση από την RAS-GTP. Η φωσφορυλιωμένη P-LRP6 ενισχύει το μονοπάτι Wnt και απομακρύνει τη β-κατενίνη από την κυτταρική μεμβράνη, συνεισφέροντας στην απώλεια της διακυτταρικής στενής επαφής και στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT=epithelial-mesenchymal transition) ⁹³.

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, είναι ελκυστικό να υποθέσουμε ότι οι μεταλλάξεις K-ras και APC λειτουργούν συνεργικά στην έναρξη της ορθοκολικής καρκινογένεσης. Ενεργοποιούνται με αμοιβαίο τρόπο : η μετάλλαξη K-ras ασκεί τις επιδράσεις της τόσο μέσω των MAP κινασών όσο και μέσω του μονοπατιού Wnt ⁸², ενώ η απενεργοποίηση APC δρα τόσο μέσω της β-κατενίνης όσο και μέσω των MAP κινασών ^{45,88}. Μερικοί κοινοί στόχοι που ρυθμίζονται από αμφότερα τα μεταλλαγμένα γονίδια, συμπληρώνουν τη συνέργεια (για παράδειγμα το c-myc ενεργοποιείται από την RAS-GTP πρωτεΐνη σε μεταφραστικό επίπεδο και από τη σηματοδότηση Wnt σε μεταγραφικό επίπεδο) ⁸². Στην εικόνα 16 αναδεικνύονται οι πολλαπλές διασυνδέσεις μεταξύ των δύο μονοπατιών, η αλληλεπίδρασή τους, η αλληλεξάρτησή τους και οι μηχανισμοί με τους οποίους τα δύο μονοπάτια εκκινούν συνεργικά την ορθοκολική καρκινογένεση.



Εικόνα 16: Οι πολλαπλοί περίπλοκοι μηχανισμοί, με τους οποίους το μονοπάτι Wnt/APC/β-κατενίνη και αυτό των MAP κινασών αλληλεπιδρούν στο κύτταρο του παχέος εντέρου και του ορθού, συνεισφέροντας στην εκκίνηση της καρκινογένεσης. Τα βέλη με το κόκκινο χρώμα δηλώνουν αναστολή του στόχου στον οποίο κατευθύνονται, τα βέλη με το πράσινο χρώμα δηλώνουν ενίσχυση του στόχου στον οποίο κατευθύνονται. Οι συμβολισμοί αποκωδικοποιούνται στο κείμενο.

9. Φυσιολογικός ρόλος και ρύθμιση του πρωτοογκογονιδίου *Ras*

Το *K-ras* είναι ένα από τα περισσότερα μελετημένα πρωτοογκογονίδια. Αποτελεί ένα από τα τρία μέλη της οικογένειας των *ras* σχετιζόμενων γονιδίων (*H-ras*, *N-ras* και *K-ras*) (*rat sarcoma virus*), τα οποία ανακαλύφθηκαν πριν από 40 χρόνια περίπου^{95,94} και εντοπίζονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 12 (12p12.1)⁷⁹. Το πρωτοογκογονίδιο *K-ras* πήρε την ονομασία του από τον ιό Kirsten sarcoma virus, ο οποίος ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου και το μετατρέπει σε ογκογονίδιο⁹⁵. Ανάλογη ογκογόνο μεταμόρφωση υφίσταται το πρωτο-ογκογονίδιο *K-ras* στον άνθρωπο από μία σειρά μεταλλάξεων, οι οποίες οδηγούν σε αλλαγή της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας και/ή σε υπερενεργοποίησή του, με αποτέλεσμα, οι πρωτεΐνες που προκύπτουν να είναι σημαντικά τροποποιημένες^{59,79,85,95-97}.

Τα τρία γονίδια *Ras* κωδικοποιούν αντίστοιχα τρεις πρωτεΐνες: HRAS, NRAS, KRAS, με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους (η τελευταία έχει δύο ισομορφές, τις KRAS4A και KRAS4B). Αυτές διαφέρουν στην υπερμεταβλητή τους περιοχή, λόγω του εναλλακτικού ματίσματος (splicing) που υφίστανται. Πρακτικά, εν τούτοις, έχουν περίπου την ίδια δομή και λειτουργούν με όμοιο τρόπο⁵⁹. Υπάρχουν διαφορές στην κυτταρική ειδικότητα, στην προνομιακή έκφραση των ειδικών ισομορφών στα διάφορα όργανα (ανάλογα με τις διαφορετικές ανάγκες του κάθε ιστού) και στην ενδογενή ογκογόνο ιδιότητα μεταξύ των τριών πρωτεϊνών^{79,95}. Το έντερο ανήκει στην ολιγομελή ομάδα των οργάνων, στα οποία, όπως αποδείχθηκε σε ποντίκια, τα *Ras* αντίγραφα και οι RAS πρωτεΐνες είναι σε αφθονία⁹⁸.

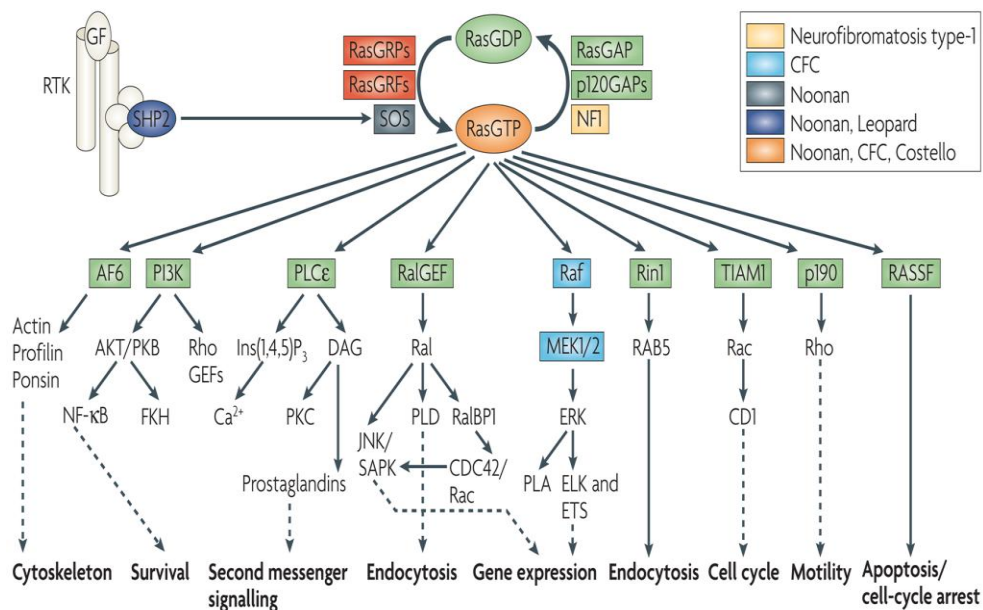
Οι RAS πρωτεΐνες είναι διαμεμβρανικές μονομερείς G πρωτεΐνες⁸⁵, που όταν συνδέονται με GTP ενεργοποιούνται (ενεργός ή ON κατάσταση), όταν δε βρεθούν συνδεδεμένες με GDP, λόγω υδρόλυσης, απενεργοποιούνται (ανενεργός ή OFF κατάσταση) (εικόνα 18). Αποτελούν κομβικό σημείο, επιτρέποντας την ενδοκυττάρια μετάδοση εξωκυττάρων μηνυμάτων, «μεταφράζουν» δηλαδή την εξωκυττάρια πληροφορία σε ενδοκυττάρια λειτουργίες. Αυτή η αποκωδικοποίηση της πληροφορίας του περιβάλλοντός των κυττάρων επιτυγχάνεται επειδή συνδέουν τον μεμβρανικό υποδοχέα EGFR με τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες-στόχους. Ο υποδοχέας EGFR αποτελεί σημείο ενσωμάτωσης και ολοκλήρωσης πολλών ομοιοστατικών σημάτων και πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών, μιτογόνων, ορμονών και του οξειδωτικού stress⁷⁹. Η σύνδεση του EGFR με ειδικούς παράγοντες οδηγεί στην ενεργοποίησή του, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεΐνη RAS σε ON state (RAS-GTP) και αυτή ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια (εικόνα 17), εκ των οποίων το βασικότερο είναι ο καταρράκτης των MAP κινασών (εικόνα 18). Αυτός ξεκινά από την ενεργό μορφή της RAS (RAS-GTP) και συνεχίζει με διαδοχικά κύματα φωσφορυλίωσης (Raf=MAPKKK, Mek=MAPKK, Erk=MAPK)⁵⁹. Η φωσφορυλίωση ενεργοποιεί τον κάθε μεσολαβητή, γεγονός που οδηγεί στη φωσφορυλίωση του επόμενου. Τελική κατάληξη είναι η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (εικόνες 17 και 18).

Η πρωτεΐνη RAS συντίθεται στα ελεύθερα ριβοσώματα ως διαλυτή ανενεργή πρωτεΐνη, και, αφού υποστεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου και ασκεί το βιολογικό της ρόλο⁹⁹. Έχει δραστηριότητα GTPάσης, γεγονός που της επιτρέπει να λειτουργεί με δυαδικό τρόπο: η πρόσδεση GTP ενεργοποιεί την πρωτεΐνη και την κλειδώνει στην κατάσταση ON, με συνέπεια την ενεργοποίησή της και την παραγωγή των μεσολαβητών της. Αυτό όμως δε διαρκεί παρά ελάχιστα, διότι λόγω της ενδογενούς ιδιότητας της RAS να δρα ως GTPάση, το GTP μετατρέπεται τάχιστα σε GDP, προσδίδοντας στην πρωτεΐνη RAS την ανενεργό μορφή της⁹⁵. Για το λόγο αυτό, η πρωτεΐνη RAS προσομοιάζεται με μοριακό διακόπτη (εικόνα 18).

Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη RAS επιδεικνύει ενδοκυττάρια διαμερισματοποίηση. Μάλιστα η διακριτή υποκυτταρική της εντόπιση καθορίζει και τη λειτουργική της σηματοδότηση ¹⁰⁰. Έτσι, η συνδεδεμένη με την κυτταρική μεμβράνη KRAS μπορεί να επάγει κυτταρική μεταμόρφωση, ενώ η μιτοχondριακή της εντόπιση επάγει απόπτωση ^{95,101}. Η διαφορετικότητα στη λειτουργία της πρωτεΐνης RAS οφείλεται **1^ο**, στη συσχέτισή της με διακριτές νανοαθροίσεις (nanoclusters) πρωτεϊνών και λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίες διευκολύνουν τη σηματοδότηση, συγκεντρώνοντας επιλεκτικά κάποια από τα στοιχεία που στοιχειοθετούν τους καταρράκτες σηματοδότησης (downstream effectors) ¹⁰⁰ και **2^ο**, στη μεμβρανική, κυτταρική και υποκυτταρική συσχέτιση της KRAS με τους μεσολαβητές, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για να επιτελέσει τις διάφορες λειτουργίες της ⁹⁵.

Από προηγούμενες μελέτες έχει αναδειχθεί η σημαντική συνεισφορά του φυσιολογικού πρωτοογκογονιδίου *Ras* στην αποτροπή της ογκογένεσης. Αν και υπάρχουν σπάνιες αναφορές που υποστηρίζουν την ογκογενετική ικανότητα του wt (φυσιολογικού) *K-ras* σε συγκεκριμένους τύπους κακοήθων νεοπλασιών ¹⁰³, στη συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων ¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ η υπερέκφραση του wt *K-ras* αναστέλλει την διαδικασία καρκινογένεσης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η υπερπαραγωγή της φυσιολογικής κυτταροπλασματικής RAS πρωτεΐνης δημιουργεί σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Raf, σχεδόν εξαντλώντας την, καθώς τα εξαιρετικά περιορισμένα επίπεδα Raf πρωτεΐνης δεν επιτρέπουν στην ενεργό πρωτεΐνη RAS να ασκήσει τη δράση της (εικόνα 17) ⁹⁹. Η αντιογκογόνος δράση του πρωτοογκογονιδίου *Ras* έχει φανεί ιδιαίτερα στην διαδικασία της ορθοκολικής καρκινογένεσης σε ποντίκια, όπου απεδείχθη ότι το φυσιολογικό αλληλίο *Ras* μπορεί να καταστείλει τη δράση του αλληλόμορφου μεταλλαγμένου *Ras* ¹⁰⁹.

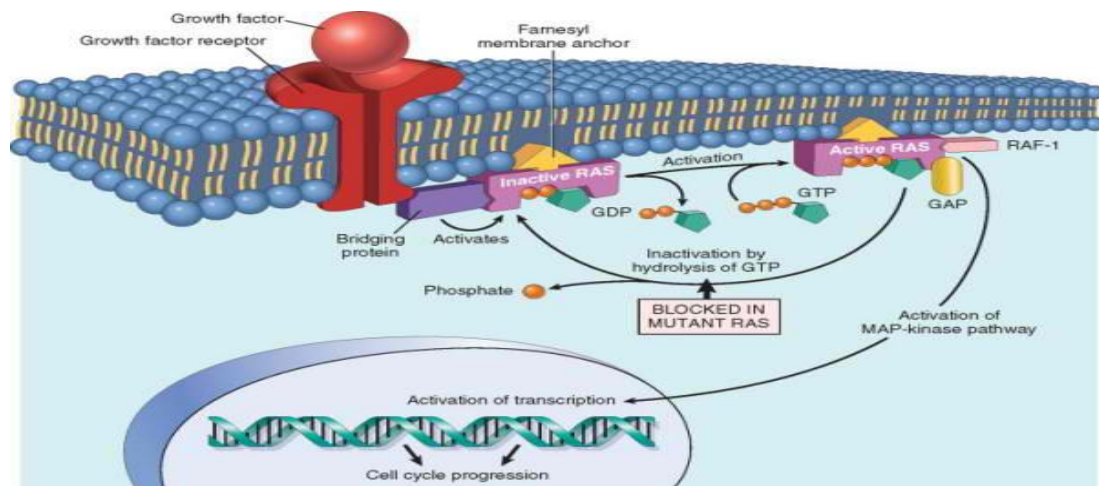
Υπό φυσιολογικές συνθήκες το πρωτοογκογονίδιο *K-ras* εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, γεγονός που ρυθμίζεται από τον υποκινητή του ¹⁰². Πιο συγκεκριμένα, εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα των φυσιολογικών κολονικών κρυπτών ⁹⁷. Παρά τους χαμηλούς ρυθμούς έκφρασής του, το πρωτοογκογονίδιο *K-ras* διαδραματίζει ρόλο στην ομοιόσταση των κυττάρων σε όλο το μήκος της κρύπτης. Μάλιστα έχει βρεθεί, ότι, σε αντίθεση με τη φωσφορυλίωση της Erk που ανιχνεύεται μόνο στο άνω τμήμα των κρυπτών, η φωσφορυλίωση της Mek ανιχνεύεται σε όλη την έκταση των κρυπτών του κολονικού επιθηλίου ⁸⁵. Μολονότι η πρωτεΐνη RAS ασκεί πολλαπλές ευεργετικές δράσεις της, οι οποίες συμβάλλουν στην ομοιόσταση του κόλου, έχει δείχθει ότι η παρουσία του φυσιολογικού αλληλόμορφου (wt *K-ras*) δεν είναι απολύτως απαραίτητη για τη λειτουργία του εντερικού επιθηλίου ⁸⁵, εφόσον οι φυσιολογικές δραστηριότητες του κόλου δεν επηρεάζονται από την απώλεια του πρωτοογκογονιδίου *K-ras* ¹¹⁰.



Εικόνα 17: Τα σηματοδοτικά δίκτυα της RAS-GTP (από αναφορά 95).

Το πρωτοογκογονίδιο *Ras* υπό φυσιολογικές συνθήκες ρυθμίζει διάφορες σημαντικές λειτουργίες στα προγονικά κύτταρα των κολονικών κρυπτών (εικόνα 17), όπως :

1. Την οργάνωση του κυτταροσκελετού (έχει επίδραση σε μόρια, όπως η ακτίνη^{94,95}).
2. Την ιστική ακεραιότητα, μέσω της συσσώρευσης μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και της δημιουργίας ισχυρών συνδέσεων στις πλευρικές επιφάνειες των κυττάρων των κρυπτών⁹⁴.
3. Την επαγωγή της έκφρασης πολλαπλών γονιδίων, τόσο μέσω των μεσολαβητών των οδών Raf και Ral⁹⁵ (εικόνα 17) όσο και μέσω της πυρηνικής ρύθμισης που επάγεται από την πυρηνική μετατόπιση ασβεστίου και της υποβοήθησης της μετάφρασης⁹⁴.
4. Την επιβίωση των κυττάρων στα αρχικά στάδια προώθησής τους από τη βάση της κρύπτης, μέσω της **αναστολής της απόπτωσης** (αλληλεπίδραση με την οδό PI3K/AKT και απενεργοποίηση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAD (Bcl-2 associated agonist of cell death^{97,103}).
5. Την **προαγωγή της απόπτωσης** στα ώριμα κολονικά κύτταρα στην επιφάνεια της κρύπτης, η οποία επάγει την αποφολίδωσή τους και ολοκληρώνει τον κύκλο ανανέωσής τους. Αυτή η λειτουργία επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAX (Bcl-2 associated X protein)^{85,95}. Η εντελώς διακριτή επίδρασή του πρωτοογκογονιδίου *Ras* στη λειτουργία της απόπτωσης κατευθύνεται από την ισορροπία αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μηχανισμών⁹⁷.
6. Την επαγωγή της κυτταρικής αύξησης^{85,95}.
7. Την διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (εικόνες 17 και 18)⁹⁵.
8. Τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων σε ώριμα κύτταρα^{85,95}.
9. Την ομαλή προώθησή των προγονικών κυττάρων κατά μήκος των κρυπτών, λειτουργία που γίνεται εφικτή μέσω της επαγωγής της κινητικότητάς τους (εικόνα 17)^{85,95}.



Εικόνα 18 : Η πρωτεΐνη RAS είναι ο σύνδεσμος μεταξύ εξωκυττάριων μηνυμάτων και ενδοκυττάριων λειτουργιών. Η μεμβρανική πρωτεΐνη RAS αποτελεί συνδετικό κρίκο, ο οποίος «μεταφράζει» τα μηνύματα του εξωκυττάριου περιβάλλοντος σε τροποποίηση των ενδοκυττάριων λειτουργιών, κυρίως δε συμβάλλει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτό το επιτυγχάνει, επιτελώντας στο ακέραιο το ρόλο της ως μοριακού διακόπτη : όταν το Ras δεν είναι μεταλλαγμένο (wt), η πρωτεΐνη RAS βρίσκεται κυρίως σε ανενεργό κατάσταση (RAS-GDP) και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σταματά, ενώ όταν το Ras είναι μεταλλαγμένο, η πρωτεΐνη RAS βρίσκεται κυρίως σε ενεργό κατάσταση (RAS-GTP) και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός προάγεται (από αναφορά 111).

Η δραστηριότητα του πρωτοογκογονιδίου *Ras* και της φυσιολογικής πρωτεΐνης RAS (RAS-GDP) στο κολονικό επιθήλιο ρυθμίζεται ως εξής :

- i. Αμοιβαία αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση από το μονοπάτι Wnt (κεφάλαιο 8).
- ii. Αλληλεπίδραση με μονοπάτια σπουδαία για την κυτταρική διαίρεση, όπως με την οδό PI3K⁹², καθώς και με τον φρουρό του γονιδιώματος *TP53*^{95,112,113}.
- iii. Η πρωτεΐνη RAS-GTP (ενεργός) αυτοαπενεργοποιείται σε υπερβραχύτατο χρονικό διάστημα από τα σχηματισμό της, λόγω της ενδογενούς GTPάσης δραστηριότητας που η ίδια διαθέτει και λόγω της υπερπολλαπλασίας (X100.000) αύξησης αυτής της δραστηριότητας από τις GAPs (GTPase activating proteins) που η ίδια επάγει⁵⁹. Αντιθέτως η RAS-GDP (ανενεργός) ενεργοποιείται από τους guanine nucleotide exchange factors (GEFs) προς RAS-GTP. Κατά συνέπεια η σχέση GAPs/ GEFs και η ρύθμιση αυτών από άλλα σήματα καθορίζει το βαθμό δραστηριότητας της πρωτεΐνης RAS. Πολλοί αυξητικοί παράγοντες και διάφορες κυτοκίνες δρουν έμμεσα στη λειτουργία έκφρασης διαφόρων γονιδίων, μέσω της δράσης τους στην αναλογία GAPs/ GEFs και, δι' αυτής, στην πρωτεΐνη KRAS (**upstream regulation**). Για παράδειγμα ο PDGF και η neurofibromin-1 ενισχύουν τη δραστηριότητα των GAPs ενώ η πρωτεΐνη Cdc25 -που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των μυκήτων- ενισχύει τη δραστηριότητα των GEFs⁹⁵.
- iv. Μετα-μεταγραφική ρύθμιση : τα μικρού μήκους RNA (miRNAs) επηρεάζουν τη μεταγραφή τόσο του πρωτοογκογονιδίου *K-ras* όσο και άλλων μεσολαβητών του δρόμου των MAP κινασών, δρώντας άλλοτε κατασταλτικά (όπως το let-7 που δρα καταστέλλοντας τη μεταγραφή του *K-ras*) και άλλοτε ευεργετικά σε αυτή^{79, 113, 114}.
- v. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις : Για να αγκυροβοληθεί η πρωτεΐνη KRAS στην κυτταρική μεμβράνη χρειάζεται την προσθήκη μορίων που την καθιστούν ικανή να συνδεθεί με τα λιπίδια αυτής. Τα μόρια αυτά συνδέονται στο καρβοξυτελικό της άκρο και είναι για μεν την πρωτεΐνη KRAS4A ένα μόριο λυσίνης για δεν την πρωτεΐνη KRAS 4B ένα μόριο κυστεΐνης⁹⁵.

10. Γιατί η *K-ras* μετάλλαξη συνιστά δυνητικά ένα εναλλακτικό μοριακό εναρκτήριο γεγονός στην ορθοκολική καρκινογένεση ;

Δεδομένης της επιβεβαιωμένης αλληλεξάρτησης ανάμεσα στα μονοπάτια των MAP κινασών και του Wnt/APC, θα μπορούσε η μετάλλαξη *K-ras* να αποτελεί το γεγονός που δίνει το έναυσμα για την απενεργοποίηση του APC ; Οι *K-ras* μεταλλάξεις είναι οι πιο συχνές γενετικές αλλοιώσεις στον ορθοκολικό καρκίνο^{115,116}. Ταυτόχρονα, θεωρούνται οι επικρατούσες ογκογόνες μεταλλάξεις στον ορθοκολικό καρκίνο⁸⁶. Βρίσκονται ανάμεσα στις πρωιμότερες γενετικές τροποποιήσεις της διαδικασίας της ορθοκολικής καρκινογένεσης¹¹⁷, παρά την τεκμηριωμένη γνώση ότι η *K-ras* μετάλλαξη είναι δυνατόν να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο αυτής¹¹⁸. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι παρούσες στο 50-95% των δυσπλαστικών ACF^{119,120}, στο 15-78% των ορθοκολικών αδενωμάτων^{121,122} και στο 36-42% των ορθοκολικών καρκίνων¹²³.

Οι σημειακές μεταλλάξεις *K-ras* στα κωδικόνια 12 και 13 του εξωνίου 2 και στο κωδικόνιο 61 του εξωνίου 3 είναι *de-novo* μεταλλάξεις: η παρουσία τους εξαρτάται από την τυχαία ενεργοποίηση του πρωτοογκογονιδίου *K-ras* κατά τη διάρκεια της ζωής υγιών ατόμων, είτε λόγω της έκθεσής τους σε καρκινογόνο είτε λόγω σποραδικών λαθών μεταγραφής¹²⁴. Από την άποψη αυτή, η μετάλλαξη *K-ras* αποτελεί ένα είδος δοσίμετρου της έκθεσης του κόλου ενός ατόμου σε δεδομένη χρονική στιγμή στα καρκινογόνα¹²⁵.

Η μετάλλαξη *K-ras* υφαίνει ένα εκτεταμένο δίκτυο που συνεισφέρει στη δημιουργία του φαινοτύπου του πολύποδα. Έχει την ικανότητα να προκαλεί όλα τα χαρακτηριστικά, που συνιστούν τη σφραγίδα του καρκίνου, όπως αυτά έχουν καθορισθεί και τεκμηριωθεί²⁹: αυξάνει την τοπική φλεγμονή^{95,97,115}, προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καταστέλλει την απόπτωση, απορρυθμίζει την παραγωγή ενέργειας, αυξάνει την αναδιαμόρφωση του στρώματος (stroma remodeling)⁵⁰, επάγει και ενισχύει τη γενωμική αστάθεια¹²⁶⁻¹³⁶, επάγει την αγγειογένεση και ενεργοποιεί την τοπική διήθηση και τη μετάσταση⁹⁷.

Η ενεργοποίηση του πρωτοογκογονιδίου *Ras* φαίνεται ότι είναι ζωτική για την σηματοδότηση των εξωκυττάρων μιτογόνων. Τα κύτταρα που φέρουν κάποια σημειακή μετάλλαξη στο *K-ras* είναι επιρρεπή να αποκτήσουν επιπλέον γενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες είναι απόλυτα αναγκαίες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση¹¹⁷. Πράγματι, η μετάλλαξη *K-ras* αποδείχθηκε ότι προωθεί την καρκινογένεση στο κόλον¹³⁹. Μελέτες σε πειραματόζωα απέδειξαν ότι η μετάλλαξη *K-ras* αποτελεί το σύνδεσμο ανάμεσα στην αιτία (καρκινογόνο) και το αποτέλεσμα (νεοπλασία)¹⁴⁰, εφόσον αυτή είναι δυνατόν να ανιχνευθεί σε ιστολογικά φυσιολογικούς ορθοκολικούς ιστούς 2-15 εβδομάδες μετά την έκθεση σε καρκινογόνο και μόνο 2 εβδομάδες πριν την έναρξη της νεοπλασίας⁵⁵. Συνεπώς, μολονότι η μετάλλαξη *K-ras* δεν είναι επαρκής για να προσφέρει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης που θα οδηγήσει σε νεοπλασματική αύξηση^{117,120,125,137}, είναι πιθανόν να θέτει τα φυσιολογικά κύτταρα σε αυξημένο κίνδυνο να μεταμορφωθούν σε καρκινικά^{117,125,128}. Παρόλα αυτά αυτή η γενετική αλλοίωση είναι αυτοπεριοριζόμενη σε απουσία άλλων γενετικών τροποποιήσεων¹²⁰. Αυτή η έλλειψη ογκογενετικής αυτάρκειας της *K-ras* μετάλλαξης οφείλεται πιθανόν στην ογκοκατασταλτική δράση που ασκεί το φυσιολογικό αλληλόμορφο στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο^{99,109}, στην εξάντληση της πρωτεΐνης Raf (βλέπε κεφάλαιο 9) ή στη γήρανση που επάγεται από ογκογονίδιο (oncogene-induced senescence)^{95,141}. Αξίζει να τονισθεί ότι η μετάλλαξη *K-ras* δεν είναι ικανή να προκαλέσει γήρανση, όταν το APC είναι μεταλλαγμένο^{85,115,142}.

Επιπλέον και πιθανόν σημαντικότερα των προαναφερομένων, ισχυρές ενδείξεις μας ωθούν να ισχυρισθούμε ότι η μετάλλαξη *K-ras* εκπληρεί τα κριτήρια του μοντέλου της

επαγόμενης από ογκογονίδιο βλάβης (oncogene-induced DNA damage model). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, τα ογκογονίδια προκαλούν stress αντιγραφής στο DNA · οι ανοιγμένες έλικες (forks) του DNA καταρρέουν, με συνέπεια να συμβαίνουν γενετικά γεγονότα (μικροαπώλειες νουκλεοτιδίων, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, διασπάσεις της διπλής έλικας του DNA), τα οποία δημιουργούν γενωμική αστάθεια⁷³. Παρόλα αυτά η όλη διαδικασία σταματά στην προκαρκινική αλλοίωση, η οποία δεν εξαλλάσσεται σε καρκίνο, λόγω των αντικαρκινικών φραγμών που εγείρουν η απόπτωση και η κυτταρική γήρανση^{73,141}. Αυτός ο αμυντικός μηχανισμός έχει τεκμηριωθεί στα ορθοκολικά αδενώματα, στα οποία η περιορισμένη δραστηριότητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συμπίπτει χρονικά με την αυξημένη επίπτωση απόπτωσης και γήρανσης στο νεόπλασμα⁷³.

Το ογκογονίδιο *K-ras* ασκεί τη δράση του στη φάση S, κατά την οποία συμβαίνει ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων. Το μεταλλαγμένο *Ras* αυξάνει το stress αντιγραφής, προκαλώντας επίμονη αντιγραφική δραστηριότητα, η οποία συνίσταται σε αυξημένο αριθμό ελίκων αντιγραφής (replication forks)^{97,143}: αμφότερα προκαλούν θραύσεις στη διπλή έλικα του DNA (DSBs) και την **αντίδραση στη βλάβη του DNA** (DNA damage response, DDR)^{97,142}. Η DDR ενεργοποιείται από τους ανάλογους αισθητήρες (DDR sensors) και καθοδηγεί το εν δυνάμει μεταμορφούμενο κύτταρο προς τις εξής τέσσερις πιθανές κατευθύνσεις: προς γήρανση, προς απόπτωση⁹⁷ (για αποφυγή ογκογόνου μετασχηματισμού), προς πολλαπλασιασμό του *Ras*-μεταλλαγμένου κυττάρου στο οποίο έχουν ολοκληρωθεί με επιτυχία οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης, είτε, τέλος, προς πολλαπλασιασμό του *Ras*-μεταλλαγμένου κυττάρου με ελαττωματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA¹³⁵. Αυτή η τελευταία κατεύθυνση είναι πολύ σημαντική, διότι αναπόφευκτα προκαλεί γενωμική αστάθεια⁹⁷. Συμβαίνει σε περίπτωση κατάρρευσης των ελίκων, λόγω αντιγραφικής πίεσης και συσσώρευσης γενετικών βλαβών σε τελικούς τελεστές του DDR^{97,135}. Η μετάλλαξη στο *K-ras* είναι, ως εκ τούτου, μείζων αιτιολογικός παράγοντας πρόκλησης και εγκατάστασης γενωμικής αστάθειας^{126-136,142-144}.

Τέλος και εξαιρετικά σημαντικό, το μεταλλαγμένο *K-ras* οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) μέσω φωσφορυλίωσης της GATA-6, της εξαρτώμενης από τις MAP κινάσες. Η παραγωγή των ROS ενισχύεται επιπλέον μέσω ενός φαύλου κύκλου: τα ROS αυξάνουν απευθείας την ογκογόνο ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS, η οποία αυξάνει την δράση των MAP κινάσων, οι οποίες προκαλούν περαιτέρω αύξηση της παραγωγής ROS⁷⁴. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) που «γεννώνται» από την RAS είναι στην πράξη **μιτογόνα σήματα**: προκαλούν βλάβη στο DNA, θραύσεις στη διπλή έλικα του DNA (DSBs) και οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR. Φαίνεται ότι η συμβολή τους στην επαγόμενη από το *K-ras* κυτταρική μεταμόρφωση είναι κρίσιμη και καίριας σημασίας^{142,143}. Είναι απολύτως απαραίτητες για να επιτύχουν τα *Ras*-μεταλλαγμένα κύτταρα το ογκογόνο τους αποτέλεσμα: τα κύτταρα που φέρουν την ογκογόνο μετάλλαξη *K-ras* εξαρτώνται από τις ROS για τον πολλαπλασιασμό τους. Ομοίως, η ενεργοποίηση του DDR μηχανισμού από τις ROS εξαρτάται από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διότι παρατηρείται μόνο σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα⁷⁵ (εικόνα 16).

Εν κατακλείδι, επειδή: 1^ο η μετάλλαξη στο *K-ras* είναι γενεσιουργός κατάσταση αμφότερων των πηγών απενεργοποίησης των ts-genes (δηλαδή αφενός προκαλεί τις DSBs που επάγουν την απώλεια της ετεροζυγωτίας, αφετέρου «γεννά» ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που προκαλούν σημειακές μεταλλάξεις, βλέπε σελίδα 47), και, 2^ο η μετάλλαξη στο *K-ras* είναι τεκμηριωμένο ότι ευθύνεται για την πρόκληση και την εγκατάσταση της – άκρως απαραίτητης για την απόκτηση των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων του καρκίνου – γενωμικής αστάθειας, η *K-ras* μετάλλαξη αποτελεί υπονήφια εναρκτήρια μετάλλαξη στη διαδικασία της ορθοκολικής καρκινογένεσης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Το θεωρητικό υπόβαθρο και το σκεπτικό της μελέτης

Έναυσμα για την παρούσα ερευνητική προσπάθεια αποτέλεσε η τεκμηριωμένη γνώση ότι η μετάλλαξη στο ογκογονίδιο *K-ras* έχει ανιχνευθεί στο φυσιολογικό βλεννογόνο παχέος εντέρου ή ορθού πασχόντων από ορθοκολικό καρκίνο^{109,125,137}, αποτελώντας μάλιστα προγνωστικό δείκτη για μελλοντική ανάπτυξη καρκίνου στο ίδιο έντερο¹⁴⁵.

Η **θεωρητική βάση** της παρούσας έρευνας βασίσθηκε στα ακόλουθα βιβλιογραφικά δεδομένα :

- Το πρωτοογκογονίδιο *K-ras* κατέχει σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση⁹⁵.
- Η *K-ras* μετάλλαξη είναι *de novo* μετάλλαξη (δεν είναι κληρονομούμενη), αποκτάται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός φυσιολογικού ατόμου, είτε λόγω έκθεσης του πρωτοογκογονιδίου *K-ras* σε κάποιο καρκινογόνο είτε λόγω σποραδικών λαθών στη διαδικασία μεταγραφής. Κατά συνέπεια, η παρουσία της στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του βλεννογόνου του παχέος εντέρου και του ορθού δηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά έχουν πιθανότατα εκτεθεί είτε σε κάποιο καρκινογόνο είτε σε άλλο εξωγενή παράγοντα που έχει πλήξει την πιστότητα μεταγραφής¹²⁴.
- Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, συχνότατα απαντώμενοι στον καθημερινό τρόπο ζωής του σύγχρονου ανθρώπου (μεταξύ αυτών το κάπνισμα και το αλκοόλ) έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν *K-ras* μεταλλάξεις στον ορθοκολικό βλεννογόνο, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην διαδικασία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο^{5,146-148}.
- Η *K-ras* μετάλλαξη αποτελεί, για δεδομένη χρονική στιγμή, ένα είδος δοσίμετρου της προηγηθείσης έκθεσης του κόλου ενός ατόμου σε καρκινογόνα¹²⁵.
- Η *ras* μετάλλαξη συμπεριλαμβάνεται ανάμεσα στις πρωιμότερες γενετικές ανωμαλίες που συμβαίνουν στην διαδικασία ορθοκολικής καρκινογένεσης¹¹⁷.
- Η μετάλλαξη *K-ras* προκαλεί δυνητικά όλα τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου⁹⁷, συνδεδεμένη κυρίως αιτιολογικά με την άκρως απαραίτητη για την καρκινογένεση γενωμική αστάθεια¹²⁶⁻¹³⁶.
- Η μετάλλαξη *K-ras* είναι δυνητικά υπεύθυνη για την επαγόμενη από ογκογονίδιο βλάβη στο DNA κατά την πορεία της ογκογένεσης (oncogene-induced DNA damage model)⁷³⁻⁷⁵.
- Υπό την επίδραση της μεταλλαγμένης RAS πρωτεΐνης, το κύτταρο εξαναγκάζεται σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό^{79,85, 95-97,102}.
- Στο πολυσταδιακό στάδιο της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο οι ανώμαλες κρυπτικές εστίες (ACFs) προέρχονται από το φυσιολογικό βλεννογόνο μέσω πολύπλοκων μηχανισμών^{53,54,63,65} και αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ του φυσιολογικού βλεννογόνου και του πρώιμου αδενώματος³⁹.
- Στις ανώμαλες κρυπτικές εστίες⁵³ η μετάλλαξη *K-ras* ανιχνεύεται σε ιδιαίτερα μεγάλα ποσοστά (50-95%)^{109,111,112}. Μάλιστα, σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, αντιπροσωπεύει γενετική αλλοίωση πρωθύστερη της απενεργοποίησης του APC^{54,63,80}.
- Στα ορθοκολικά αδενώματα η μετάλλαξη *K-ras* ανιχνεύεται σε ποσοστά που ποικίλουν από μελέτη σε μελέτη (15-78%)^{121,122}.
- Ο φυσιολογικός βλεννογόνος από έντερο με ορθοκολικό καρκίνο μπορεί να φέρει τη μετάλλαξη *K-ras*, με το ποσοστό θετικότητας να κυμαίνεται, ανάλογα με τη μελέτη, από 5% έως 25 %^{109,125,137,138,156,157}.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, υποθέσαμε ότι μία μετάλλαξη πρώιμη στη διαδικασία της ογκογένεσης, αποκτώμενη μάλιστα κατά τη διάρκεια της ζωής και προκαλούμενη από περιβαλλοντικούς παράγοντες (lifestyle), θα μπορούσε να είναι παρούσα, εκτός από τις προκακοήθεις αλλοιώσεις (ACFs και αδενώματα) **και** στο φυσιολογικό κολονικό βλεννογόνο, επάγοντας υπό προϋποθέσεις την καρκινογένεση. Μέχρι τούδε δεν είχε ανιχνευθεί η *K-ras* μετάλλαξη σε φυσιολογικό βλεννογόνο από παχύ έντερο ή ορθό με καλοήθεις πολύποδες. Ωστόσο, από λιγοστές μελέτες υπήρχαν ενδείξεις για τέτοιο ενδεχόμενο : η μετάλλαξη στο *K-ras* ήταν δυνητικά ανιχνεύσιμη σε κόπρανα ατόμων με αδενώματα στο παχύ έντερο, χωρίς να έχει καταστεί σαφές εάν η προέλευσή της ήταν τα αδενώματα, ο φυσιολογικός ορθοκολικός βλεννογόνος ή άλλη πηγή^{149,150}.

Έτσι το αρχικό μας **σκεπτικό** ήταν να αποδείξουμε την ενδεχόμενη παρουσία της μετάλλαξης *K-ras* (κωδικόνιο 12 και 13 του εξωνίου 2) σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο από παχύ έντερο ή/και ορθό χωρίς οποιαδήποτε παθολογία, καθώς και σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο από παχύ έντερο/ορθό με καλοήθεις πολύποδες, στο οποίο δεν ανιχνεύεται σύγχρονη κακοήθεια. Συνεπώς, θα μπορούσε να τεκμηριωθεί τόσο η πρώιμη εμφάνιση της *K-ras* μετάλλαξης στην αλληλουχία γεγονότων της ορθοκολικής καρκινογένεσης όσο και η περίπτωση να είναι η πλέον πρώιμη γενετική αλλοίωση στη σειρά των αλληλοδιαδόχων σταδίων της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και του ορθού, τουλάχιστον σε υποομάδα περιπτώσεων. Επιπλέον, με δεδομένο το γεγονός ότι το πρωτοογκογονίδιο *K-ras* είναι ιδιαίτερα ογκογόνο όταν μεταλλαχθεί¹¹⁵, θεωρήσαμε ότι κατά την περίπτωση που ανιχνευόταν η *K-ras* μετάλλαξη σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο, θα δικαιούμασταν να ισχυριστούμε ότι η ογκογένεση είχε ήδη ξεκινήσει στην περιοχή του οργάνου από όπου είχε ληφθεί ο αντίστοιχος ιστός. Επίσης, αποφασίσαμε να αναδείξουμε την πιθανή προγνωστική σημασία της ανίχνευσης της *K-ras* μετάλλαξης σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο ατόμων χωρίς ιστορικό ΚΠΕΟ.

Τέλος, αποφασίσαμε με ανιχνεύσουμε τη μετάλλαξη στα κωδικόνια 12 και 13 του *K-ras* σε καλοήθεις ορθοκολικούς πολύποδες και σε καρκινικό ιστό κόλου (πρωτοπαθή και δευτεροπαθή), με στόχευση να δείξουμε εάν υπήρχε οποιαδήποτε συσχέτιση ή εξάρτηση μεταξύ της ανίχνευσης της *K-ras* μετάλλαξης σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο και της παρουσίας της σε σύγχρονα καλοήθη ή/και κακοήθη νεοπλάσματα του παχέος εντέρου και του ορθού.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιλογή των συμμετεχόντων στην έρευνα ήταν η απουσία κληρονομικού ιστορικού καρκίνου παχέος εντέρου ή ορθού, εστιάζοντας με τον τρόπο αυτό στη συμβολή του μεταλλαγμένου *K-ras* αποκλειστικά στη διαδικασία της σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης.

2. Αρχικό πλάνο της έρευνας

Για τους πιο πάνω λόγους θεωρήθηκε σημαντικό να μελετηθεί η χρονική αλληλουχία των μεταλλάξεων του ογκογονιδίου *K-ras* τόσο κατά τα πρώιμα όσο και κατά τα όψιμα στάδια της ορθοκολικής καρκινογένεσης. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος θεωρήθηκε σκόπιμο να ανιχνευθεί η παρουσία της μετάλλαξης τόσο σε νεοπλασματικό ιστό παχέος εντέρου όσο και σε φυσιολογικό ορθοκολικό ιστό.

Φυσιολογικός ορθοκολικός βλεννογόνος ορίστηκε αυτός, ο οποίος είναι φυσιολογικός τόσο μακροσκοπικά (ενδοσκοπικά) όσο και μικροσκοπικά (ιστοπαθολογικά). Συνολικά αποφασίστηκε να μελετηθούν οι ακόλουθες κατηγορίες φυσιολογικού ορθοκολικού βλεννογόνου :

A. Φυσιολογικός βλεννογόνος ατόμων χωρίς κληρονομικό ιστορικό ΚΠΕΟ των οποίων η κολονοσκόπηση είχε άριστη προετοιμασία και ήταν μακροσκοπικά απόλυτα φυσιολογική (απουσία φλεγμονώδους εξεργασίας, όπως λοιμώδους κολίτιδας, ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου ή φλεγμονής άλλης αιτιολογίας, απουσία εκκολπωμάτων, απουσία πολυπόδων ή καρκίνου παχέος εντέρου, απουσία άλλης παθολογίας από το παχύ έντερο, τον τελικό ειλέο και το ορθό). Η ομάδα αυτή (ομάδα ελέγχου) ονομάστηκε **control group (ή control bowel)**.

B. Φυσιολογικός βλεννογόνος ατόμων με καλοήθειες πολύποδες παχέος εντέρου ή ορθού χωρίς κληρονομικό ιστορικό ΚΠΕΟ, χωρίς συνυπάρχοντα καρκίνο ή άλλη μείζονα παθολογία από το παχύ έντερο και το ορθό σε κολονοσκόπηση με άριστη προετοιμασία. Στην ομάδα αυτή των συμμετεχόντων αποφασίστηκε να μελετηθεί τόσο ο φυσιολογικός βλεννογόνος πλησίον του πολύποδα (δηλαδή σε απόσταση μικρότερης των 2 εκ από τον πολύποδα) όσο και σε απόσταση μακριά από τον πολύποδα (δηλαδή σε απόσταση μεγαλύτερη των 15 εκ από τον πολύποδα). Η ομάδα αυτή ονομάστηκε **cancer-free group (ή cancer-free bowel)**.

Γ. Φυσιολογικός βλεννογόνος ατόμων με καρκίνο παχέος εντέρου ή ορθού με ή χωρίς συνυπάρχοντες καλοήθειες πολύποδες παχέος εντέρου ή ορθού, χωρίς κληρονομικό ιστορικό ΚΠΕΟ και χωρίς συνυπάρχουσα μείζονα παθολογία (πχ ευρήματα ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντεροπάθειας) από το παχύ έντερο ή το ορθό σε κολονοσκόπηση με άριστη προετοιμασία. Στην ομάδα αυτή των ασθενών αποφασίστηκε να μελετηθεί τόσο ο φυσιολογικός βλεννογόνος πλησίον του πολύποδα και του καρκίνου (δηλαδή σε απόσταση μικρότερης των 2 εκ από το νεόπλασμα) όσο και ο φυσιολογικός βλεννογόνος μακριά από τον πολύποδα και τον καρκίνο (δηλαδή σε απόσταση μεγαλύτερη των 15 εκ από το νεόπλασμα). Η ομάδα αυτή ονομάστηκε **cancer-bearing group (ή cancer-bearing bowel)**.

Έτσι το αρχικό πλάνο προέβλεπε να συλλεγούν ιστικά ορθοκολικά δείγματα και ακολούθως αυτά να ελεγχθούν για σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του εξωνίου 2 του πρωτο-ογκογονιδίου *K-ras* (**mt12** και **mt13** αντίστοιχα) από την ομάδα ελέγχου (φυσιολογικοί ιστοί), από το cancer-free group (φυσιολογικοί ιστοί και καλοήθειες νεοπλασματικοί ιστοί) και από το cancer-bearing group (φυσιολογικοί ιστοί, καλοήθειες νεοπλασματικοί ιστοί και κακοήθειες νεοπλασματικοί ιστοί). Στο cancer-bearing group αποφασίστηκε να ελεγχθούν επιπλέον και μεταστατικοί ηπατικοί ιστοί, δευτεροπαθείς από τον σύστημα καρκίνο (όπου αυτοί ήταν διαθέσιμοι) για **mt12** και **mt13**. Στα καλοήθη νεοπλάσματα αποφασίστηκε να συμπεριληφθούν τα παραδοσιακά (ή κλασικά) αδενώματα, αδενωματοειδείς δηλαδή πολύποδες με χαμηλόβαθμη ή/και υψηλόβαθμη επιθηλιακή δυσπλασία, καθώς και οδοντωτά καλοήθη νεοπλάσματα (βάσει των τρεχόντων κριτηρίων κατάταξης αυτά περιλαμβάνουν τους οδοντωτούς πολύποδες, τους υπερπλαστικούς πολύποδες και τους μικτούς πολύποδες, δηλαδή πολύποδες με ιστολογικά χαρακτηριστικά

υπερπλαστικών και αδενωματοδών πολυπόδων ⁴²). Τα παραδοσιακά αδενώματα αποφασίσθηκε να χωρισθούν περαιτέρω σε προχωρημένα και μη προχωρημένα, σύμφωνα με τα τρέχοντα κριτήρια (τα προχωρημένα αδενώματα είναι αυτά που ενδοσκοπικά έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 1 εκ ή/και λαχνωτό στοιχείο πάνω από 80% ή/και υψηλόβαθμη δυσπλασία ιστολογικά ^{151,152}), καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα προχωρημένα αδενώματα φέρουν την *K-ras* μετάλλαξη πιο συχνά από τα μη προχωρημένα ^{52,121} και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα για κακοήθη εξαλλαγή ¹²¹.

Για όλες τις ενδοσκοπικά φυσιολογικές περιοχές, σε όλες τις ομάδες των συμμετεχόντων, αποφασίσθηκε να επιβεβαιωθεί ότι αυτές αντιστοιχούσαν όντως σε ιστολογικά φυσιολογικούς ιστούς. Αυτή η ταυτοποίηση θα επιτυγχανόταν τόσο με τις κλασικές ιστολογικές τεχνικές (χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνη), όσο και με προχωρημένες ιστολογικές τεχνικές (πχ ειδικές χρώσεις), όπου αυτό θα κρινόταν απαραίτητο.

3. Στόχοι της έρευνας

Ως αρχικοί **στόχοι** της παρούσας έρευνας καθορίστηκαν οι ακόλουθοι:

- I. Ο καθορισμός της συχνότητας εμφάνισης της K-ras μετάλλαξης στο φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο των ασθενών του cancer-bearing bowel και των ατόμων του cancer-free bowel, η σύγκριση μεταξύ των συχνοτήτων αυτών καθώς και η σύγκριση μεταξύ όλων των υποκατηγοριών των φυσιολογικών ιστών στις δύο ομάδες ασθενών (δηλαδή ιστών μακριά ή κοντά στον καρκίνο ή τον καλοήγη πολύποδα, αδενωματώδη ή οδοντωτό).
- II. Ο καθορισμός της συχνότητας εμφάνισης της K-ras μετάλλαξης στον φυσιολογικό (ενδοσκοπικά **και** ιστολογικά) ορθοκολικό βλεννογόνο της ομάδας ελέγχου και η σύγκρισή της με όλες τις υποκατηγορίες φυσιολογικών ορθοκολικών ιστών των cancer-free bowel και cancer-bearing bowel.
- III. Ο καθορισμός της συχνότητας ανίχνευσης των K-ras μεταλλάξεων σε καλοήθεις (δυσπλαστικούς/οδοντωτούς) πολύποδες από το cancer-free bowel συγκριτικά με την συχνότητα ανίχνευσης των K-ras μεταλλάξεων σε αντίστοιχους πολύποδες από το cancer-bearing bowel.
- IV. Η καταγραφή της εξέλιξης του ποσοστού ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων στο K-ras κατά τα διαδοχικά στάδια της ογκογένεσης του ορθοκολικού καρκίνου, και, εάν αυτό προέκυπτε από τα δεδομένα, η ανάπτυξη ενός προτύπου προοδευτικής και βαθμιαίας αύξησης του ποσοστού K-ras μεταλλάξεων στα διακριτά στάδια της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και του ορθού.
- V. Η αναζήτηση πιθανής στατιστικής σχέσης της μετάλλαξης στο K-ras με το φύλο, την ηλικία και με την εντόπιση του νεοπλασματος, καλοήθους ή κακοήθους, στο δεξιό κόλον, στο αριστερό κόλον ή στο ορθό.
- VI. Η τεκμηρίωση πιθανής συμφωνίας του K-ras status μεταξύ των νεοπλασματικών αλλοιώσεων του παχέος εντέρου και του ορθού (καρκινικών και προκαρκινικών) με τον φυσιολογικό παρακείμενο ή απομακρυσμένο σε αυτές βλεννογόνο.
- VII. Η τεκμηρίωση πιθανής συμφωνίας του K-ras status μεταξύ του καρκινικού ιστού του παχέος εντέρου και των αντίστοιχων μεταστατικών αλλοιώσεων.
- VIII. Η σύγκριση της συχνότητας παρουσίας της K-ras μετάλλαξης μεταξύ των καλοήθων πολυπόδων και του φυσιολογικού βλεννογόνου σε cancer-free bowel.
- IX. Η πιθανότητα να είναι εφικτό να προκαθορισθεί (σε παχύ έντερο χωρίς καρκίνο) το K-ras status ενός καλοήθους πολύποδα του παχέος εντέρου ή του ορθού από το K-ras status του παρακείμενου ή του απομακρυσμένου φυσιολογικού ορθοκολικού βλεννογόνου.
- X. Η πιθανότητα να είναι εφικτό να προκαθορισθεί (σε κόλον με καρκίνο,) το K-ras status του καρκίνου από K-ras status του παρακείμενου ή του απομακρυσμένου φυσιολογικού ορθοκολικού βλεννογόνου.
- XI. Η αναγνώριση της σημασίας της ανίχνευσης της K-ras μετάλλαξης σε φυσιολογικό ορθοκολικό ιστό ή σε έναν καλοήγη πολύποδα από ένα παχύ έντερο ή ορθό χωρίς καρκίνο, όσον αφορά την πιθανότητα μελλοντικής εμφάνισης ΚΠΕΟ.
- XII. Η εκτίμηση της προωμότητας της εμφάνισης της μετάλλαξης K-ras κατά την πορεία της ογκογένεσης στον ΚΠΕΟ.
- XIII. Το ενδεχόμενο να αποτελεί, τουλάχιστον σε υποκατηγορία ατόμων με ΚΠΕΟ ή σε άτομα που έχει ξεκινήσει η διαδικασία ορθοκολικής καρκινογένεσης, η K-ras μετάλλαξη την προωμότερη γενετική αλλοίωση, η οποία εκκινεί και επιταχύνει τη

διαδικασία. Η ανακάλυψη αυτή θα τροποποιούσε δυνητικά τη χρονική διαδοχή των μοριακών γεγονότων, που συμβαίνουν στην ορθοκολική καρκινογένεση, σε αυτή την υποκατηγορία των ασθενών.

- XIV.** Το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθεί στην πράξη η *K-ras* μετάλλαξη ως εύχρηστος βιοδείκτης για την έγκαιρη αναγνώριση μιας εξελισσόμενης διαδικασίας ογκογένεσης στο παχύ έντερο και οι πιθανές ευεργετικές συνέπειες αυτού του ερευνητικού δεδομένου στην κλινική πράξη.
- XV.** Η αναζήτηση κάποιου θεωρητικού εναλλακτικού προτύπου που να ισχύει στην ορθοκολική καρκινογένεση, σε περίπτωση που η χρονική σειρά των γενετικών γεγονότων προτεινόταν να τροποποιηθεί.

4. Βιοηθική έγκριση του πρωτοκόλλου της έρευνας

Το πρωτόκολλο της μελέτης κατατέθηκε με λεπτομέρεια και σαφήνεια και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Το ερευνητικό πρωτόκολλο που προτείνουμε είναι σύμφωνο με την ισχύουσα νομοθεσία, συμπλέει απόλυτα με τον Κώδικα Ιατρικής Δεοντολογίας, που ισχύει από το 2005 στην Ελληνική Επικράτεια ¹⁵³, και ακολουθεί τα προβλεπόμενα της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Η Διακήρυξη του Ελσίνκι καθορίζει τις ηθικές αρχές τις οποίες είναι υποχρεωμένοι να ακολουθούν οι ερευνητές που κάνουν ιατρική έρευνα σε ανθρώπους, τις ευθύνες και τις αρμοδιότητες που απορρέουν από την εφαρμογή των αρχών αυτών στην πράξη, όπως η εθελούσια συναίνεση των ανθρώπων που συμμετέχουν στην έρευνα μετά από λεπτομερή ενημέρωσή τους, η αρχειοθέτηση των δεδομένων και η αυστηρή διασφάλιση του απορρήτου τόσο κατά την πορεία της έρευνας όσο κατά τη δημοσίευση των δεδομένων ¹⁵⁴.

Από όλους τους ασθενείς ή υγιείς εθελοντές, των οποίων το υλικό χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη (χειρουργικό παρασκεύασμα ή βιοπτικό υλικό από ιστούς/βιοψίες που ελήφθησαν μέσω της κολονοσκόπησης ή ιστολογικό υλικό ηπατικής βιοψίας) ζητήθηκε και ελήφθη, κατόπιν λεπτομερούς ενημέρωσής τους για τους σκοπούς της έρευνας, έγγραφη συγκατάθεση, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το ιστολογικό τους υλικό για τη συγκεκριμένη έρευνα. Η φόρμα της συγκατάθεσης είχε ήδη εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας. Ελήφθη επίσης συγκατάθεση για τη συλλογή και καταγραφή όλων των απαραίτητων στοιχείων (δημογραφικά, προσωπικές συνήθειες, κληρονομικό και ατομικό ιστορικό, ευρήματα από την αντικειμενική εξέταση, παθολογοανατομικά, ακτινολογικά, αιματολογικά, γενετικά και ενδοσκοπικά δεδομένα) των ασθενών και των εθελοντών που συμμετείχαν στην έρευνα. Τηρήθηκε με απόλυτη αυστηρότητα το ιατρικό απόρρητο τόσο κατά τη συλλογή, μεταφορά και εργαστηριακή επεξεργασία των δειγμάτων όσο και κατά την (στατιστική και μη) επεξεργασία των αποτελεσμάτων : όλα τα δεδομένα των ασθενών (τα γνωστά πριν την είσοδό τους στην έρευνα καθώς και αυτά που πρόέκυψαν κατά τη διάρκεια της έρευνας) καταχωρήθηκαν σε ειδική τράπεζα βιοπληροφορικής, έγινε τυχαιοποίηση των δειγμάτων, απόκρυψη των προσωπικών στοιχείων και κωδικοποίηση των ασθενών.

Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε συγκεντρωτικούς πίνακες, χρησιμοποιώντας τον κωδικό του ασθενούς ή του υγιούς εθελοντή· με την τακτική αυτή αποκλείστηκε η ταυτοπροσωπία των συμμετεχόντων. Επίσης τηρήθηκε αυστηρά το ιατρικό απόρρητο κατά τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων καθώς και κατά τη μη δημοσίευση των στοιχείων των ασθενών που αποκλείστηκαν εκ των υστέρων από τη μελέτη. Όλα τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν κατά τη διάρκεια της έρευνας γνωστοποιήθηκαν εγκαίρως και στους συμμετέχοντες στην έρευνα, είτε εξ αυτών άλλαζε το πλάνο της εν γένει αντιμετώπισής τους είτε εξ αυτών δεν προέκυπτε οποιαδήποτε επίπτωση στη διαγνωστική και θεραπευτική στρατηγική που θα ακολουθούσε ο θεράπων Ιατρός. Η χρήση των στοιχείων των ασθενών και εθελοντών κατευθύνθηκε αποκλειστικά είτε για τη δημοσίευσή τους σε αναγνωρισμένου κύρους διεθνές επιστημονικό περιοδικό (αναφέρεται στο abstract) είτε ως μέρος της παρούσας δημοσίευσης. Αποφασίσθηκε, με κοινή συναίνεση μεταξύ των συμμετεχόντων και των ερευνητών της παρούσης μελέτης και συνυπογραφή εγγράφως, ότι ενδεχόμενη μελλοντική χρήση είτε των δειγμάτων είτε των δεδομένων των συμμετεχόντων για οποιοδήποτε σκοπό, θα απαιτούσε την έγγραφη συγκατάθεση των συμμετεχόντων ή των νομίμων αντιπροσώπων τους.

5. Δεδομένα ασθενών και υγιών εθελοντών. Κριτήρια αποκλεισμού.

Υποψήφια για είσοδο στη μελέτη ήταν άτομα που προσήλθαν για ενδοσκόπηση του κατώτερου πεπτικού, με σκοπό τη διερεύνηση διαφόρων συμπτωμάτων (αίμα από το ορθό, εναλλαγές κενώσεων, διάρροια ή δυσκοιλιότητα προσφάτου ενάρξεως, κοιλιακό άλγος ή αναιμία) ή για προληπτικό έλεγχο (check-up). Το κόλον (παχύ έντερο και ορθό) των συμμετεχόντων χαρτογραφήθηκε προσεκτικά και τα βίντεο αρχειοθετήθηκαν. Οι κολονοσκοπήσεις διενεργήθηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα κατά τη διάρκεια της 4ετίας Ιούνιος 2012 έως Ιούνιος 2016. Αυτές έλαβαν χώρα τόσο στα Νοσοκομεία της Αθήνας όπου ο υποψήφιος διδάκτωρ διενεργεί ή διενεργούσε διαγνωστικές και επεμβατικές κολονοσκοπήσεις (ΔΘΚΑ ΥΓΕΙΑ, ΕΥΡΩΚΛΙΝΙΚΗ ΑΘΗΝΩΝ, ΛΕΥΚΟΣ ΣΤΑΥΡΟΣ ΑΘΗΝΩΝ, ΙΑΤΡΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΜΑΡΟΥΣΙΟΥ) όσο και στο Ιδιωτικό του Ιατρείο. Χρησιμοποιήθηκε Narrow-Band-Imaging magnifying κολονοσκόπιο (NBI-ME colonoscope) Q-CF180L, OLYMPUS, προκειμένου να είναι εφικτή η ενδοσκοπική ανίχνευση και διάγνωση τόσο των οδοντωτών όσο και των μη οδοντωτών (κλασικών) αδενωμάτων¹⁵⁵. Το κολονοσκόπιο αυτό διαθέτει ένα επιπλέον πλεονέκτημα : το κανάλι βιοψίας είναι ευρείας διαμέτρου (3,6 χιλ), ικανό να δεχθεί λαβίδα jumpb, με την οποία εξασφαλίζεται η λήψη ιστοτεμαχιδίων ικανού μεγέθους. Τα άτομα στα οποία βρέθηκαν πολύποδες ή/και καρκίνος παχέος εντέρου ή ορθού εισερχόντουσαν στη μελέτη.

Έτσι, 69 ασθενείς περιελήφθησαν αρχικά στην έρευνα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλό μας, από τη στιγμή που ένας ασθενής θα εισέρχεται στη μελέτη, θα ελαμβάνετο ιστολογικό υλικό από επιλεγμένες ιστικές περιοχές (**tissue-regions**) : δηλαδή τόσο νεοπλασματικές, δηλαδή από τα καλοήγη ή/και τα κακοήγη νεοπλάσματα, όσο και από φυσιολογικές, δηλαδή από φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο, παρακείμενο **και** απομακρυσμένο στα νεοπλάσματα αυτά. Τα εμπόδια της εμβολωματικής κατανομής της K-ras μετάλλαξης στον φυσιολογικό βλεννογόνο^{138,156} και της ανομοιογενούς παρουσίας της μετάλλαξης τόσο στα αδενώματα όσο και στα καρκινώματα του παχέος εντέρου^{157,158} υπερπηδήθηκαν σε μεγάλο βαθμό, κάνοντας 8 διαφορετικές λήψεις από κάθε ιστική περιοχή (φυσιολογική και νεοπλασματική) και χρησιμοποιώντας jumpb λαβίδα βιοψίας. Η jumpb λαβίδα αφενός λαμβάνει μεγαλύτερο όγκο ιστού (τουλάχιστον τριπλάσιο από τον ιστικό όγκο που μπορεί να αποκτήσει μια συμβατική λαβίδα βιοψίας), αφετέρου μπορεί να **συλλάβει με την ίδια λήψη τουλάχιστον τρία διαφορετικά ιστοτεμαχίδια** χωρίς αυτά να κινδυνεύουν να απολεσθούν εντός του εντερικού αυλού. Συνεπώς, ο ιστός εντός της λαβίδας βιοψίας jumpb σε κάθε λήψη αυτής αντιστοιχούσε σε όγκο τουλάχιστον δέκα μικρών κλασικών ιστοτεμαχιδίων.

Προκειμένου να ολοκληρωθεί ο διττός έλεγχος, οι ιστοί από τις δύο πρώτες λήψεις (τα 2 πρώτα δείγματα), που προορίζονταν για μοριακή ανάλυση, τοποθετούντο σε ειδικό απορροφητικό χαρτί, με σκοπό τον προσανατολισμό τους. Ακολούθως εμβαπτίζοντο σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης. Οι ιστοί από τις επόμενες έξι λήψεις (τα 6 επόμενα δείγματα), που προορίζονταν για ιστολογική διάγνωση, ελαμβάνοντο με διαφορετική jumpb λαβίδα βιοψίας και εμβαπτίζοντο σε διάλυμα φορμαλδεΰδης. Προκειμένου να μην αναμειχθεί το υλικό από τις νεοπλασματικές βλάβες με το υλικό από τον φυσιολογικό ιστό, ελαμβάνετο αρχικά βιοπτικό υλικό από φυσιολογικό ιστό κεντρικότερα (κεφαλικά) της βλάβης, και, ακολούθως, με διαφορετική λαβίδα βιοψίας, βιοπτικό υλικό από τη βλάβη. Σε περίπτωση που το νεόπλασμα εντοπιζόταν στο τυφλό, το υλικό από φυσιολογικό ιστό ελαμβάνετο με διαφορετική λαβίδα βιοψίας από φυσιολογική περιοχή του αριστερού κόλου ή του εγκάρσιου, στην οποία δεν υπήρχε πολύποδας.

Πολύποδες μεγαλύτεροι από 1 εκ σε διάμετρο απομακρυνόντουσαν πλήρως με βρόχο πολυπεκτομής, ενώ πολύποδες μικρότεροι του 1 εκ σε διάμετρο εξαιρούντο πλήρως με τη jumbo λαβίδα βιοψίας. Το βιοπτικό υλικό από τον φυσιολογικό και από τον καρκινικό ιστό ελαμβάνετο με jumbo λαβίδα βιοψίας αποκλειστικά (διαφορετική λαβίδα για τον καρκίνο από αυτή που χρησιμοποιείται στον φυσιολογικό ιστό).

Στην πορεία, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την πιο προχωρημένη διάγνωση του πολύποδα ή των πολύποδων που βρισκόντουσαν στην κολονοσκόπηση : 42 ασθενείς (N1) που είχαν καλοήθεις πολύποδες (αδενωματώδεις ή/και οδοντωτούς) ετέθησαν στο cancer-free group (ή cancer-free bowel) και 27 ασθενείς (N2) με καρκίνο απετέλεσαν το cancer-bearing group (ή cancer-bearing bowel).

Μία ακόμα ομάδα με 13 υγιείς εθελοντές (N3, 7 άνδρες και 6 γυναίκες) απετέλεσε την ομάδα ελέγχου. Δεν είχαν κληρονομικό ιστορικό ΚΠΕΟ, είχαν επίσης λάβει πλήρη ενημέρωση για τους σκοπούς της έρευνας και είχαν δώσει έγγραφη συγκατάθεση για λήψη υλικού από μακροσκοπικά φυσιολογικό βλεννογόνο παχέος εντέρου και ορθού κατά τη διάρκεια προληπτικής ή διαγνωστικής κολονοσκόπησης που επρόκειτο να υποβληθούν (εφόσον αυτή αποδεικνυόταν απόλυτα φυσιολογική) καθώς και για επεξεργασία αυτού του υλικού για ερευνητικούς σκοπούς. Στην ομάδα αυτή ελαμβάνοντο τυχαίες βιοψίες με jumbo λαβίδα βιοψίας κατά τη διάρκεια της κολονοσκόπησης: από κάθε φυσιολογικό κόλον ελαμβάνοντο βιοψίες από 3 ιστικές περιοχές (**tissue-regions**), μία από το δεξιό κόλον, μία από το αριστερό κόλον και μία από το ορθό. Γινόντουσαν 4 λήψεις (4 δείγματα) ανά ιστική περιοχή, δύο για μοριακό έλεγχο (άρα 6 δείγματα ανά υγιή εθελοντή) και δύο για ιστολογική διάγνωση (6 δείγματα επίσης ανά υγιή εθελοντή). Κάθε δείγμα περιείχε ομοίως τρία ευμεγέθη ιστοτεμαχίδια. Όλα τα δείγματα τα προοριζόμενα για μοριακό έλεγχο (78 συνολικά) εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης, ενώ όλα τα δείγματα τα προοριζόμενα για διαγνωστικό έλεγχο (78 συνολικά) εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης.

Στους 82 συμμετέχοντες (N1+N2+N3) ελαμβάνετο πλήρες ατομικό και κληρονομικό ιστορικό, διενεργείτο ενδελεχής κλινική εξέταση και γινόταν λεπτομερής βιοχημικός και αιματολογικός έλεγχος, εξέταση κοπράνων και υπερηχογράφημα άνω και κάτω κοιλίας. Η ιστολογική εξέταση των φυσιολογικών ιστών επιβεβαίωνε την ενδοσκοπική εικόνα και η εξέταση των νεοπλασματικών ιστών διέκρινε τις καλοήθεις από τις κακοήθεις νεοπλασίες. Ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο συμπλήρωσαν τον έλεγχο τους με αξονική τομογραφία θώρακα, μαγνητική τομογραφία άνω και κάτω κοιλίας, εξειδικευμένο αιματολογικό έλεγχο και, όταν αυτό εκρίνετο αναγκαίο, με PET/CT.

Η ομάδα του cancer-bearing group διευρύνθηκε με 46 ακόμα (=N4) ασθενείς, των οποίων το χειρουργικό υλικό φυλασσόταν είτε στο Εργαστήριο της Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών (μονιμοποιημένο με τη μορφή κύβων παραφίνης ή με τη μορφή φρέσκου ιστού που είχε ψυχθεί στους -80 °C) ή σε Παθολογοανατομικά Εργαστήρια διαφόρων Νοσοκομείων της Αττικής με τη μορφή κύβων παραφίνης (στα Νοσοκομεία αυτά είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε κολεκτομή ασθενείς του υποψήφιου διδάκτορα για θεραπεία ορθοκολικού καρκίνου). Σε 7 από τους 46 αυτούς ασθενείς (N4) υπήρχε διαθέσιμος επιπλέον ηπατικός ιστός, μεταστατικός από τον αντίστοιχο ορθοκολικό καρκίνο, υπό μορφή κύβων παραφίνης και αυτό είχε ληφθεί είτε μέσω βιοψίας ήπατος είτε κατά τη διάρκεια της ανοικτής χειρουργικής επέμβασης. Έτσι, η ομάδα του cancer-bearing group αριθμούσε προσωρινά 73 μέλη (N2+N4) και ο συνολικός αριθμός συμμετεχόντων έφθασε προσωρινά τα 128 μέλη (N1+N2+N3+N4).

Από τους 115 (**N1+N2+N4**) ασθενείς με καρκίνο ή/και καλοήθεις πολύποδες παχέος εντέρου ή ορθού αποκλείστηκαν από τη συνέχεια της μελέτης όσοι πληρούσαν ένα ή περισσότερα από τα πιο κάτω **κριτήρια αποκλεισμού** :

1. αυτοί στους οποίους υπήρχε διαθέσιμος ιστός μόνο από ένα εκ των διαδοχικών σταδίων της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου,
2. αυτοί οι οποίοι - μετά από λεπτομερή καταγραφή του γενεαλογικού ιστορικού - απεδείχθησαν ότι είχαν κληρονομικό ιστορικό ΚΠΕΟ,
3. αυτοί των οποίων ο μακροσκοπικά φυσιολογικός βλεννογόνος ήταν παθολογικός ιστολογικά,
4. αυτοί με σπάνιο ιστολογικό τύπο κακοήθειας ή καλοήθους πολύποδα (πχ καρκινοειδές ή νεανικός πολύποδας),
5. αυτοί με ανεπαρκές υλικό πολύποδα (που να επαρκούσε δηλαδή τόσο για διάγνωση όσο και για μοριακό έλεγχο),
6. αυτοί, στους οποίους ο πολύποδας, όπως αποδείχθηκε από το ιστολογικό παρασκεύασμα, δεν είχε εξαιρεθεί πλήρως, παρά την ενδοσκοπική περιγραφή,
7. αυτοί, στους οποίους αποδείχθηκε (με απεικονιστικό, ενδοσκοπικό ή βιοπτικό έλεγχο) ότι έπασχαν από συνυπάρχουσα εντερική νόσο (όπως εκκολπωματική νόσος του εντέρου ή ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντεροπάθεια-ΙΦΝΕ),
8. ασθενείς με ΚΠΕΟ που είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε κάποια μορφή θεραπείας (ακτινοθεραπεία σε κοιλιακή ή πυελική χώρα και/ή χημειοθεραπεία),
9. αυτοί με πλημμελή εντερική προετοιμασία στην κολονοσκόπηση, η οποία δεν μας επέτρεπε να αποκλείσουμε άλλους συνυπάρχοντες παροραθέντες πολύποδες.

Τελικά παρέμειναν στη μελέτη 53 άτομα, που χωρίστηκαν σε 3 ομάδες (groups) : 24 ασθενείς (=N5) στο cancer-bearing group, 16 ασθενείς (=N6) στο cancer-free group και 13 (=N3) υγιείς εθελοντές στο control group. Ο μ.ο. ηλικίας των ατόμων στο cancer-bearing group ήταν 72,67 έτη, στο cancer-free group ήταν 56,70 έτη και στην ομάδα ελέγχου ήταν 62,84 έτη (πίνακας 1). Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά (δημογραφικά, ενδοσκοπικά, ιστοπαθολογικά, μοριακά) των ασθενών που ανήκουν στις δύο ομάδες ασθενών αναγράφονται στους πίνακες 3, 4 και 5 (για το cancer-bearing group, το cancer-free group και το control group αντίστοιχα).

Στο cancer-bearing group (N5) μελετήθηκαν συνολικά **78** ιστικές περιοχές (tissue-regions), 34 φυσιολογικές και 44 νεοπλασματικές (3,25 ιστικές περιοχές ανά συμμετέχον μέλος). Στο cancer-free group (N6) μελετήθηκαν συνολικά **50** ιστικές περιοχές, 27 φυσιολογικές και 23 νεοπλασματικές (3,125 ιστικές περιοχές ανά συμμετέχον μέλος). Στην ομάδα ελέγχου (N3) μελετήθηκαν συνολικά **39** φυσιολογικές ιστικές περιοχές (3 ιστικές περιοχές ανά συμμετέχον μέλος), ως προαναφέρθη. Συνολικά μελετήθηκαν **167** ιστικές περιοχές, 100 φυσιολογικές και 67 νεοπλασματικές (3,15 ιστικές περιοχές ανά συμμετέχον μέλος κατά μ.ο.) (πίνακας 1). Επειδή δύο ιστικά δείγματα ανά ιστική περιοχή (tissue-region) εξετάστηκαν για K-ras μετάλλαξη, συνολικά στη μελέτη εξετάστηκαν **334 ιστικά δείγματα** για σημειακή μετάλλαξη στο K-ras (πίνακας 1). Κάθε δείγμα περιείχε, ως αναφέρθη, τρία ευμεγέθη ιστοτεμαχίδια.

Ομάδα	Cancer-bearing group	Cancer-free group	Control group	ΣΥΝΟΛΟ
Σύμβολο	N5	N6	N3	N
Αριθμός μελών	24	16	13	53
Α/Γ	18/6	9/7	7/6	34/19
Ηλικιακό φάσμα	50-86	19-80	43-78	19-86
μ.ο. ηλικίας	73,25	58,68	62,84	66,30
Φυσιολογικές ιστικές περιοχές	34	27	39	100
Νεοπλασματικές ιστικές περιοχές	44	23	0	67
Ολικές ιστικές περιοχές	78	50	39	167
Ιστικές περιοχές ανά μέλος	3,25	3,125	3	3,15
Φυσιολογικά ιστικά δείγματα	68	54	78	200
Νεοπλασματικά ιστικά δείγματα	88	46	0	134
Ολικά ιστικά δείγματα	156	100	78	334
Ιστικά δείγματα ανά μέλος	6,5	6,25	6	6,3

Πίνακας 1 : Πανόραμα των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα. Δημογραφικά χαρακτηριστικά, ιστικές περιοχές (φυσιολογικές και νεοπλασματικές) και ιστικά δείγματα (φυσιολογικά και νεοπλασματικά) στις 3 ομάδες των συμμετεχόντων (cancer-bearing group, cancer-free group, control group). Τα ιστικά δείγματα στον πίνακα αναφέρονται σε αυτά που προορίζονταν για έλεγχο για τη μετάλλαξη στο K-ras.

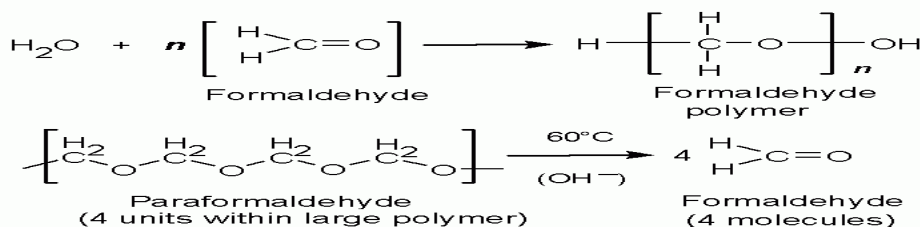
Ομάδα	Cancer-bearing group	Cancer-free group	Σύνολο
Μέσο μέγεθος των μη προχωρημένων αδενωμάτων (σε εκ)	0,80	0,55	0,63
Μέσο μέγεθος των προχωρημένων αδενωμάτων (σε εκ)	1,35	1,30	1,32
Μέσο μέγεθος των συμβατικών αδενωμάτων (σε εκ)	1,075	0,871	0,95
Μέσο μέγεθος των οδοντωτών αδενωμάτων (σε εκ)	0,44	0,57	0,52
Μέσο μέγεθος των καρκινωμάτων (σε εκ)	2,1	--	2,1
Αναλογία εντόπισης συμβατικών αδενωμάτων (δεξιό κόλον/αριστερό κόλον)	4/4	8/6	12/10
Αναλογία εντόπισης οδοντωτών αδενωμάτων (δεξιό κόλον/αριστερό κόλον)	0/5	2/7	2/12
Αναλογία εντόπισης συνολικά των καλοήθων πολυπόδων (δεξιό κόλον/αριστερό κόλον)	4/9	10/13	14/22
Αναλογία εντόπισης καρκινωμάτων (δεξιό κόλον/αριστερό κόλον)	8/16	--	8/16
Ben-NF	0	12	12
Ca-NF	11	0	11
Aden-NN	2	8	10
Serr-NN	0	7	7
Ben-NN	2	15	22
Ca-NN	21	0	21
Σύνολο φυσιολογικών περιοχών	34	27	61
Aden-t	8	14	22
Serr-t	5	9	14
Καλοήθεις νεοπλασματικές περιοχές	13	23	36
Ca-t	24	0	24
Meta-t	7	0	7
Κακοήθεις νεοπλασματικές περιοχές	31	0	31
Σύνολο νεοπλασματικών περιοχών	44	23	67
Σύνολο ιστικών περιοχών	78	50	128

Πίνακας 2 : Ενδοσκοπικά χαρακτηριστικά και κατανομή των ιστικών περιοχών στο cancer-bearing group και στο cancer-free group. Τα σύμβολα που αντιστοιχούν στις ιστικές περιοχές (κόκκινο χρώμα) επεξηγούνται στη σελίδα 76.

6. Συλλογή, μονιμοποίηση και επεξεργασία ιστικών δειγμάτων. Κοπή ιστολογικών τομών.

Οι ιστοί που συλλέγονταν μέσω της λαβίδας βιοψίας κατά τη διάρκεια της κολονοσκόπησης εμβαπτίζοντουσαν σε υγρή φορμαλδεΰδη ή παραφορμαλδεΰδη, αποσκοπώντας στην προσωρινή διατήρησή τους, χωρίς να αλλοιώνεται η υποκυτταρική δομή τους. Ο σκοπός της μονιμοποίησης είναι η διατήρηση της μορφολογικής, μοριακής και χημικής σύστασης του ιστού για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Είναι απαραίτητη για την αποφυγή αλλοιώσεων που δημιουργούνται είτε λόγω αυτόλυσης είτε λόγω επιμόλυνσης, αλλοιώσεις που τροποποιούν τη μορφολογία. Ουσιαστικά, το υλικό χρησιμεύει για να σταθεροποιεί τις λεπτές δομικές λεπτομέρειες των κυττάρων και των ιστών επί μακρόν πριν χρησιμοποιηθούν είτε για εξέταση σε οπτικό ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για ιστολογική διάγνωση είτε για μοριακό έλεγχο για ανίχνευση μεταλλάξεων ή αλλαγών στη δομή των πρωτεϊνών ¹⁵⁹.

Η φορμαλδεΰδη στην ουδέτερη ρυθμιστική μορφή της, είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μονιμοποιητικό υλικό στη διαγνωστική παθολογοανατομία ¹⁶⁰. Η μονιμοποιητική της δράση οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην αντίδρασή της και τη σύνδεσή της με πρωτεΐνες. Η αρχική σύνδεση της φορμαλδεΰδης με τις πρωτεΐνες ολοκληρώνεται σε 24 ώρες, χωρίς να επηρεάζει ούτε τη δομή τους ούτε τη δομή των μορίων που συνδέονται με αυτές, όπως τα νουκλεϊνικά οξέα. Με την πάροδο όμως των ημερών, αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων, που είναι συνδεδεμένα με φορμαλδεΰδη, συμβαίνουν λόγω της ανάπτυξης γεφυρών μεθυλενίου ^{159,160}.



Εικόνα 19 : Σχηματισμός των πολυμερών της φορμαλδεΰδης (επάνω) και αποπολυμερισμός της παραφορμαλδεΰδης (κάτω) (από αναφορά 159).

Στην αμιγή μορφή της η φορμαλδεΰδη (HCHO) είναι αέριο, του οποίου τα μικρά μόρια διαλύονται γρήγορα στο νερό, αντιδρώντας χημικά μαζί του για να σχηματίσουν το υδρικό μεθυλένιο, HO-CH₂-OH. Το μονομερές αυτό της φορμαλδεΰδης, είναι η μορφή στην οποία το αέριο αυτό υπάρχει στα υδατικά διαλύματα. Τα μόρια του υδρικού μεθυλενίου αντιδρούν μεταξύ τους, σχηματίζοντας πολυμερή. Όταν τα πολυμερή είναι μικρού μήκους (2-8 μόρια), διαλύονται στο νερό, σχηματίζοντας το υδατικό διάλυμα φορμαλίνης, το οποίο έχει 37-40% φορμαλδεΰδη και 60-63% νερό. Όταν τα πολυμερή είναι μεγάλου μήκους (έως 100 μόρια), δεν διαλύονται στο νερό και κατακρημνίζονται σε σκόνη, γνωστή ως παραφορμαλδεΰδη. Συνεπώς, στο εμπόριο η φορμαλδεΰδη βρίσκεται είτε με τη μορφή φορμαλίνης (διάλυμα) είτε με τη μορφή παραφορμαλδεΰδης (σκόνη).

Το πρωτότυπο διάλυμα φορμαλίνης περιέχει περίπου 10% μεθανόλη, η οποία καθυστερεί τον πολυμερισμό των μονομερών υδρικού μεθυλενίου σε αδιάλυτη παραφορμαλδεϋδη. Στην πράξη χρησιμοποιείται αραιωμένο διάλυμα φορμαλίνης (10%). Επειδή το πρωτότυπο διάλυμα περιέχει φορμαλδεϋδη σε συγκέντρωση περίπου 40%, το διάλυμα φορμαλίνης πρακτικά περιέχει περίπου 4% φορμαλδεϋδη και 1% μεθανόλη¹⁶⁰. Η μεθανόλη έχει δύο πηγές : αφενός προστίθεται από τον κατασκευαστή και, αφετέρου, παράγεται με την αντίδραση Cannizzaro με την πάροδο του χρόνου. Με την αντίδραση Cannizzaro παράγεται επίσης και φορμικό οξύ. Έτσι, με την πάροδο του χρόνου, φορμικό οξύ και μεθανόλη αθροίζονται στο διάλυμα φορμαλίνης. Οι δύο αυτές ουσίες επιδρούν στις κυτταρικές και τις υποκυτταρικές δομές, τροποποιώντας αρνητικά τη δομική τους σταθερότητα^{159,160}.

Αντιθέτως, το διάλυμα που παρασκευάζεται από τη σκόνη της παραφορμαλδεϋδης σε νερό δεν περιέχει αρχικά καθόλου μεθανόλη (δεν προστίθεται από τον κατασκευαστή). Στο διάλυμα αυτό, η παραφορμαλδεϋδη αποπολυμερίζεται σε μονομερή φορμαλδεϋδης (δηλαδή σε μόρια υδρικού μεθυλενίου, το οποίο είναι ουσιαστικά η κύρια διαλυμένη ουσία) με την προσθήκη ανιόντων υδροξυλίου στην παραφορμαλδεϋδη υπό την επίδραση ζεστού νερού (θερμοκρασία 60° C). Τελικά παράγεται ένα διάλυμα που ρυθμίζεται σε pH 7,2-7,6. Εάν το διάλυμα παραφορμαλδεϋδης χρησιμοποιηθεί άμεσα (εντός 48ώρου από την παρασκευή του), η αντίδραση Cannizzaro δεν λαμβάνει χώρα και δεν είναι εφικτό χρονικά να παραχθεί μεθανόλη. Ως εκ τούτου, ένα διάλυμα παραφορμαλδεϋδης προτιμάται από ένα διάλυμα φορμαλίνης ως πηγή μονομερών φορμαλδεϋδης, όταν επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε ενδεχόμενες λεπτές αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών ή των νουκλεϊνικών οξέων, όπως οι σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων και ογκογονιδίων, καθώς και όταν πρόκειται να ανιχνεύσουμε λεπτές αλλαγές στη δομή των ιστών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο¹⁵⁹.

Για τους πιο πάνω λόγους, το ιστολογικό υλικό από τους πολύποδες, τον καρκίνο και τον φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου και του ορθού, το οποίο θα χρησιμοποιείτο για μοριακούς-ερευνητικούς σκοπούς (έλεγχος σημειακών μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο K-ras) συλλέγεται και διατηρείται προσωρινά (18-24 ώρες) σε διάλυμα παραφορμαλδεϋδης. Επειδή η παραφορμαλδεϋδη δεν είναι μονιμοποιητικό υλικό, το διάλυμά της χρησιμοποιείται ως γέφυρα για τη μονιμοποίηση. Στο διάστημα των 24 ωρών το αργότερο, το υλικό είχε ήδη μεταφερθεί στο εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του ΕΚΠΑ, υφίστατο καταγραφή, μακροσκοπική εξέταση, κωδικοποίηση και ταξινόμηση και ξεκινούσε άμεσα η διαδικασία μονιμοποίησης με την αντικατάσταση της παραφορμαλδεϋδης με διάλυμα φορμαλίνης 10%.

Παράλληλα, το ιστολογικό υλικό από τους πολύποδες, τον καρκίνο ή τον φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου και του ορθού, το οποίο θα χρησιμοποιείτο για διαγνωστικούς σκοπούς, εμβάπτιζτο άμεσα σε διάλυμα φορμαλίνης 10%. Στο χρονικό διάστημα της μεταφοράς των δειγμάτων στο εργαστήριο (24 ώρες) είχε ουσιαστικά ολοκληρωθεί η μονιμοποίηση (απαιτούνται συνήθως 12-24 ώρες από την εμβάπτιση). Η όποια καθυστέρηση πέραν του 24ώρου αποφεύχθηκε για να αποτραπεί η υπερμονιμοποίηση και ξήρανση του ιστού, καθώς και ο κατακερματισμός του DNA.

Όσον αφορά στον φρέσκο κατεψυγμένο ιστό, ο οποίος είχε ψυχθεί επί μακρόν στους -80° C αποψυχόταν σε θερμοκρασία δωματίου επί 48 ώρες, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς. Ακολούθως, ετίθετο και αυτός στην διαδικασία της μονιμοποίησης (εμβάπτισμός σε διάλυμα φορμαλίνης 10% για 24 ώρες περίπου).

Συνεπώς, όλα τα δείγματα (βιοπτικό σε φορμαλίνη, βιοπτικό αρχικά σε παραφορμαλδεϋδη και μετά σε φορμαλίνη, φρέσκος κατεψυγμένος ιστός σε φορμαλίνη) ακολουθούσαν κοινή πορεία, το στάδιο δηλαδή της **μονιμοποίησης** των ιστών (tissue fixation). Η φορμαλίνη είναι μονιμοποιητικό υλικό. Το διάλυμα φορμαλίνης επιλέγεται στο εργαστήριο Ιστολογίας-

Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ ως μονιμοποιητικό υλικό, επειδή η φορμαλδεΰδη διαπερνά καλά τους ιστούς και σχηματίζει δεσμούς με τις πρωτεΐνες των ιστών, διατηρώντας αρκούντως ικανοποιητικά τις λεπτές υποκυτταρικές, κυτταρικές και ιστικές δομές τους με αποτέλεσμα να διατηρείται η αντιγονικότητά τους και να είναι διαγνωστικά ακριβής η ιστολογική ταυτοποίηση του φυσιολογικού και του παθολογικού ιστού^{159,160}.

Τα δείγματα μετά την καταγραφή τους στο εργαστήριο τοποθετούνταν άμεσα σε δοχεία ή σε δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν το διάλυμα φορμαλίνης 10%. Αν τα δείγματα των ιστών ήταν μικρά, τοποθετούνταν από την αρχή σε πλαστικές κασετίνες (4,5 εκ x 2,8 εκ) μιας χρήσεως και όλες μαζί οι κασετίνες σε ένα δοχείο με καπάκι, το οποίο περιείχε το διάλυμα μονιμοποίησης. Το διάλυμα μονιμοποίησης είχε πενταπλάσιο όγκο από αυτόν των ιστών. Η μονιμοποίηση γινόταν σε ουδέτερο pH, ιδανικό για τη διαδικασία αυτή. Επειδή, ο ιστός που δεν οξυγονώνεται αναπόφευκτα οδηγείται σε ιστική υποξία, η οποία μειώνει το pH του ιστού, γινόταν ρύθμιση του μονιμοποιητικού υλικού σε ουδέτερο pH με φωσφορικά άλατα : ο ιστός επεξεργαζόταν με διάλυμα PBS (phosphate buffer saline, 50 mM φωσφορικό κάλιο, 150 mM χλωριούχο νάτριο, pH=7,2). Οι ιστοί παρέμεναν στο ψυγείο (4° C) για 12 ώρες, ακολουθούσε η ίδια διαδικασία (4° C, 12 ώρες) με νέο διάλυμα μονιμοποίησης που αντικαθιστούσε το παλιό και ακολούθως οι ιστοί μεταφερόντουσαν σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Εδώ αυξανόταν η θερμοκρασία, με σκοπό την αύξηση της ταχύτητας μονιμοποίησης, σε επίπεδο τέτοιο που να μην καταστρέφει τον ιστό. Γενικά η διάρκεια μονιμοποίησης εξαρτάτο κυρίως από το μέγεθος των ιστοτεμαχιδίων (ήταν περίπου 24 ώρες).

Οι κασετίνες με τους ιστούς μετά τη μονιμοποίηση τοποθετούνταν σε ειδικό εξάρτημα ιστοκινέτας, το οποίο ετοποθετείτο στην ιστοκινέτα και πραγματοποιείτο η **επεξεργασία** των ιστών. Στην ιστοκινέτα παρέμεναν περίπου για 24 ώρες (overnight), όπου ελάμβαναν χώρα οι διαδικασίες της επεξεργασίας των ιστών : η αφυδάτωση, η διαύγαση, η σκλήνωση και η έγκλειση.

1. Το στάδιο της αφυδάτωσης διαρκούσε 6-24 ώρες και είχε σκοπό την αφαίρεση του ενδογενούς νερού από τους ιστούς, τα κύτταρα αλλά και από το μονιμοποιητικό υλικό. Η πλήρης αφυδάτωση είναι απαραίτητη πριν τη διαδικασία έγκλεισης, διότι η παραφίνη είναι υδρόφοβη. Αυτό επιτυγχάνετο με διαδοχικά βαπτίσματα με αλκοόλες αυξανόμενου βαθμού (βαθμιαίες σειρές από μίγματα αιθανόλης με νερό : 70° σε 80° σε 96° σε 100°), ώστε να αποφευχθεί η συρρίκνωση του ιστού.
2. Το στάδιο της διαύγασης, που ερχόταν στη συνέχεια, διαρκούσε 1-2 ώρες και είχε σκοπό τη διάλυση του λίπους του ιστού και την αντικατάσταση της αλκοόλης με διαλύτη που μπορεί να αναμιχθεί τόσο με την αλκοόλη όσο και με το υλικό σκλήνωσης (παραφίνη). Χρησιμοποιείτο ως διαλύτης η ξυλόλη, με την οποία διενεργούντο διαδοχικές πλύσεις και ο ιστός αποκτούσε ημιδιαφανή όψη.
3. Οι κασετίνες με τους αφυδατωμένους ιστούς υφίσταντο ακολούθως τη φάση της σκλήνωσης με λιωμένη παραφίνη σε 56-60° C (σε ειδικό μηχανήμα σκλήνωσης με ειδικό δοχείο με υγρή παραφίνη). Η θερμότητα έχει σαν αποτέλεσμα να εξατμίζεται ο διαλύτης και οι άδειοι χώροι των ενδοκυττάρων και των μεσοκυττάρων διαστημάτων που προκύπτουν να γεμίζουν με παραφίνη.
4. Τελευταία φάση της επεξεργασίας ήταν αυτή της έγκλεισης, στην οποία οι διαποτισμένοι με παραφίνη ιστοί τοποθετούνταν σε ειδικό καλούπι που γέμιζε με υγρή παραφίνη και μεταφερόταν σε ψυχρή πλάκα όπου και στερεοποιείτο. Μετά αφαιρείτο το καλούπι και απομακρυνόταν η στερεοποιημένη παραφίνη από τις άκρες του κύβου (κύβοι ή blocks παραφίνης). Τα blocks διατηρούντο σε ψυγείο ή σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να παγώσει η παραφίνη. Η διαδικασία της

παραφίνωσης διαρκούσε συνήθως 1-6 ώρες. Με την παραφίνωση οι ιστοί γίνονται πιο δύσκαμπτοι, άρα πιο ανθεκτικοί στο κόψιμο. Όταν οι ιστοί στερεοποιηθούν, είναι έτοιμοι να μπουν στη διαδικασία κοπής ιστολογικών τομών άμεσα ή σε απώτερο χρόνο, διότι στους κύβους παραφίνης ο ιστός είναι εφικτό να παραμείνει με ασφάλεια μονιμοποιημένος και αποθηκευμένος επί μακρόν σε θερμοκρασία δωματίου (**formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, FFPE tissues**).

Η διαδικασία **κοπής των ιστολογικών τομών** προέβλεπε τη δημιουργία μικρών τομών παραφίνης, τη λήψη δηλαδή μικρής ποσότητας ιστού (< 25 mg) από τους κύβους παραφίνης. Ο κύβος παραφίνης με τον εγκλεισμένο πλέον ιστό, ετοποθετείτο και στερεωνόταν στον υποδοχέα της μικροτόμου. Η λεπίδα της μικροτόμου που θα χρησιμοποιείτο, καθαριζόταν προσεκτικά με ξυλόλη πριν την έναρξη των τομών. Η θέση του υποδοχέα ρυθμιζόταν, ούτως ώστε το block παραφίνης να έρχεται σε ελάχιστη επαφή με τη λεπίδα. Στη συνέχεια, η μικροτόμος ρυθμιζόταν στο επιθυμητό πάχος τομής (5-8 μ) και ακολουθούσε το κόψιμο. Συνήθως απορρίπταμε τις πρώτες τομές, διότι τα άκρα του κύβου παραφίνης δεν είναι κατάλληλα για καλές τομές, λόγω της μη αντιπροσωπευτικότητας του δείγματος. Μόλις άρχιζε η αλυσίδα από τομές, αυτές απομακρύνονταν από το μαχαίρι με λεπτό πινέλο. Το επόμενο βήμα εξαρτάτο από το σκοπό της ανάλυσης των τομών : σε περίπτωση που θα ακολουθούσε ιστολογική διάγνωση γινόταν έκπτυξη των τομών σε υδατόλουτρο, ενώ οι τομές που προοριζόντουσαν για απομόνωση του γενετικού υλικού τοποθετούνταν αυτούσιες χωρίς διάλυμα σε μεσαία σωλήνα μικροφυγοκέντρησης erpendorf (όγκου 2 ml) και προωθούνταν στην αίθουσα απομόνωσης του γενετικού υλικού.

7. Διαγνωστικός ιστοπαθολογικός έλεγχος. Ομαδοποίηση των ιστών.

Στο σύνολο των ιστικών περιοχών των τριών ομάδων ασθενών, ο διαγνωστικός ιστοπαθολογικός έλεγχος προηγήθηκε του μοριακού. Για να προχωρήσει ο διαγνωστικός έλεγχος, οι τομές παραφίνης εκτυσσόντουσαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 40° C και επικολλούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η επιπεδοποίηση των τομών γινόταν με την τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα, γεγονός που εξασφάλιζε την απομάκρυνση όλου του νερού από τις τομές. Επειδή οι περισσότερες χρωστικές βρίσκονται στη μορφή των υδατικών διαλυμάτων έπρεπε να απομακρύνουμε την υδρόφοβη παραφίνη, ακολουθώντας πορεία αντίστροφη αυτής της ιστοκινέτας. Για το λόγο αυτό αρχικά απομακρύνουμε την παραφίνη με ξυλόλη, ακολούθως απομακρύνουμε την ξυλόλη με αλκοόλη 100° και μετά ενυδατώνουμε τις τομές με αλκοόλη 95° και τέλος με αλκοόλη 70°. Μετά την ενυδάτωσή του ο ιστός ξεπλενόταν με νερό της βρύσης και χρωματιζόταν με το διάλυμα της βασικής χρωστικής *αιματοξυλίνη*. Στην πορεία ξεπλενόταν με νερό της βρύσης, εμβαπτιζόταν σε αμμωνιούχο νερό με 3-5 καταδύσεις, ξεπλενόταν εκ νέου με νερό βρύσης και εν τέλει χρωματιζόταν με διάλυμα της όξινης χρωστικής *ηωσίνη*. Οι ως άνω χρωστικές αναδείκνυν τα διακριτά στοιχεία των ιστών με ξεχωριστές αποχρώσεις. Η αιματοξυλίνη χρωματίζει τα βασίφιλα στοιχεία, δηλαδή τα όξινα συστατικά, όπως οι νουκλεοπρωτεΐνες, ενώ η ηωσίνη χρωματίζει τα οξύφιλα (δηλαδή τα βασικά) συστατικά, όπως οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Η επικάλυψη των ιστολογικών τομών αποτελούσε το τελευταίο στάδιο της τεχνικής και πραγματοποιείτο με κατάλληλο διάφανο υλικό, όπως το Βάλσαμο του Καναδά ή το DPX, το οποίο έχει δείκτη διάθλασης παρόμοιο με αυτόν των τομών. Οι χρωματισμένες τομές καλυπτόντουσαν με καλυπτρίδα και παραδίνονταν στους Παθολογοανατόμους του εργαστηρίου, προκειμένου να μικροσκοπήσουν τους ιστούς σε οπτικό μικροσκόπιο και να θέσουν την ιστολογική διάγνωση.

Μετά και την ολοκλήρωση του διαγνωστικού ελέγχου οι ομάδες των συμμετεχόντων οριστικοποιήθηκαν. Το σύνολο (200) των ιστικών δειγμάτων από τις μακροσκοπικά φυσιολογικές ιστικές ομάδες των τριών ομάδων (αθροιστικά: 100 tissue-regions) απεδείχθησαν ότι αντιστοιχούσαν και μικροσκοπικά σε φυσιολογικούς ιστούς. Μία μακροσκοπικά φυσιολογική περιοχή, στην οποία μικροσκοπικά είχε διαγνωσθεί κολλαγονική κολίτιδα, ανήκε σε ασθενή με διαρροϊκό σύνδρομο, που είχε ήδη αποκλεισθεί από τη μελέτη. Επίσης επιβεβαιώθηκε και μικροσκοπικά ότι καμία ιστική περιοχή δεν περιελάμβανε μείγμα καρκινικού με μη καρκινικό ιστό ούτε μείγμα νεοπλασματικού με μη νεοπλασματικό ιστό. Τέλος, απεδείχθη ότι καμία ιστική περιοχή δεν περιείχε μείγμα καλοήθους και κακοήθους νεοπλασματικού ιστού.

Οι ενδοσκοπικά χαρακτηριζόμενοι «πολύποδες» του παχέος εντέρου/ορθού αποδείχθηκε ότι ήταν καλοήγη νεοπλάσματα, ενώ στους ενδοσκοπικά διαγνωσμένους καρκίνους παχέος εντέρου ή ορθού επιβεβαιώθηκε η κακοήγης εξεργασία και ιστοπαθολογικά. Τέλος, σε μία περίπτωση αποδείχθηκε ότι ένας φαινομενικά καλοήγης πολύποδας εμπεριείχε καρκινικό ιστό και ο ασθενής περιελήφθηκε στην ομάδα του cancer-bearing bowel.

Ολοκληρώθηκε επίσης η κατηγοριοποίηση των καλοήθων πολύποδων σε οδοντωτά νεοπλάσματα και σε μη οδοντωτά νεοπλάσματα (κλασικά, συμβατικά ή παραδοσιακά αδενώματα). Στα οδοντωτά νεοπλάσματα (**Serr-t**) συμπεριελήφθησαν, βάσει των τρεχόντων κριτηρίων⁴² οι υπερπλαστικοί (**Hyperplastic polyps-HP**), οι παραδοσιακοί οδοντωτοί πολύποδες (**Traditional Serrated Adenomas –TSA**), οι άμισχοι οδοντωτοί πολύποδες (**Sessile**

Serrated Adenomas) και οι μικτοί πολύποδες (**Mixed polyps**), αυτοί δηλαδή που συνδύαζαν το οδοντωτό με το αδενωματώδες στοιχείο.

Ως κλασικά, παραδοσιακά ή συμβατικά αδενώματα (**Aden-t**) θεωρήθηκαν αυτά που είχαν χαμηλόβαθμη ή/και υψηλόβαθμη δυσπλασία χωρίς οδοντωτό ή καρκινικό στοιχείο. Σύμφωνα με την τρέχουσα ονοματολογία, ένα αδένωμα περιέχει εξ ορισμού τουλάχιστον χαμηλόβαθμη δυσπλασία (low-grade dysplasia-LGD)^{37,12,152,161-166}. Η αναφορά της υψηλόβαθμης δυσπλασίας (high-grade dysplasia-HGD) στην παθολογοανατομική έκθεση, παρότι αμφισβητείται από ορισμένους ερευνητές ως αναγκαιότητα¹⁶⁷ (χρησιμοποιούνται διαφορετικοί ορισμοί γι' αυτήν μεταξύ των Δυτικών και Ιαπώνων Παθολογοανατόμων¹⁶³ και στα περισσότερα εγχειρίδια ο ορισμός της δεν είναι σαφής^{161,162}), η αναζήτησή της και η λεπτομερής καταγραφή της στα αδενώματα της έρευνάς μας κρίθηκε απόλυτα αναγκαία : αφενός μεν είναι τεκμηριωμένη η προγνωστική σημασία της HGD για την μελλοντική ανάπτυξη κακοήθειας στο ίδιο έντερο¹⁶⁴, αφετέρου δε η HGD αποτελεί ένα από τα 3 τρέχοντα κριτήρια της σύγχρονης και ευρέως αποδεκτής κατάταξης των κλασικών αδενωμάτων σε προχωρημένα (advanced)^{151,152}.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ταξινόμησης της επιθηλιακής νεοπλασίας της Βιέννης όπως παρουσιάστηκε το 2000¹⁶⁵, σύμφωνα με το οποίο η LGD ανήκει στην κατηγορία 3 (μη διηθητική χαμηλόβαθμη νεοπλασία), ενώ η HGD στην κατηγορία 4.1 (μη διηθητική υψηλόβαθμη νεοπλασία χωρίς καρκίνωμα *in situ*)^{165,166}. Τα αδενώματα που περιείχαν μόνο χαμηλόβαθμη δυσπλασία ονοματοδοτήθηκαν **LGD**, ενώ αυτά όπου ανιχνευόταν υψηλόβαθμη δυσπλασία, ανεξάρτητα εάν συνυπήρχε ή όχι χαμηλόβαθμη δυσπλασία στο ίδιο δείγμα, ονοματοδοτήθηκαν **HGD**.

Επίσης αξιολογήθηκε η παρουσία της αναλογίας του σωληνώδους προς το λαχνωτό στοιχείο εντός του αδενώματος, και ταξινομήθηκαν ως λαχνωτά αυτά τα αδενώματα των οποίων το λαχνωτό στοιχείο υπερέβαινε το 80% του συνόλου, ως σωληνώδη αυτά που είχαν σωληνώδες στοιχείο άνω του 80% του συνόλου και ως σωληνολαχνωτά αυτά στα οποία τόσο το λαχνωτό όσο και το σωληνώδες στοιχείο κυμαινόντουσαν από 20-80%.

Τέλος, βάσει των ιστολογικών δεδομένων, καθορίστηκαν οι εννέα ακόλουθες, αμοιβαία αποκλειόμενες, κατηγορίες εξεταζομένων ιστών :

1. Ιστοί από καλοήγη παραδοσιακά αδενώματα σε έντερο με ή χωρίς ΚΠΕΟ : **Aden-t (adenomatous tissue)**
2. Ιστοί από καλοήθεις οδοντωτούς πολύποδες σε έντερο με ή χωρίς ΚΠΕΟ : **Serr-t (serrated tissue)**
3. Ιστοί από τον καρκίνο σε πάσχοντες από καρκίνο παχέος εντέρου ή ορθού : **Ca-t (cancerous tissue)**
4. Ιστοί από ηπατική μετάσταση πασχόντων από καρκίνο παχέος εντέρου ή ορθού : **meta-t (metastatic tissue)**
5. Ιστοί φυσιολογικοί παχέος εντέρου ή ορθού πλησίον κλασικών αδενωμάτων σε έντερο με ή χωρίς ορθοκολικό καρκίνο : **Aden-Nn (adenoma normal near)**
6. Ιστοί φυσιολογικοί παχέος εντέρου ή ορθού πλησίον οδοντωτών αδενωμάτων σε έντερο με ή χωρίς ορθοκολικό καρκίνο : **Serr-Nn (serrated normal near)**
7. Ιστοί φυσιολογικοί κόλου μακριά από καλοήγη (δυσπλαστικό ή οδοντωτό) πολύποδα σε έντερο χωρίς ορθοκολικό καρκίνο: **Ben-Nf (benign normal far)**
8. Ιστοί φυσιολογικοί παχέος εντέρου ή ορθού σε έντερο με ΚΠΕΟ, οι οποίοι εντοπίζονται πλησίον του καρκίνου : **Ca-Nn (cancer normal near)**
9. Ιστοί φυσιολογικοί παχέος εντέρου ή ορθού σε έντερο με ΚΠΕΟ, οι οποίοι εντοπίζονται μακριά από τον καρκινικό ιστό : **Ca-Nf (cancer normal far)**

Υποκατηγορίες της κατηγορίας 1 καθορίσαμε το LGD group και το HGD group, ενώ υποκατηγορίες της κατηγορίας 2 καθορίσαμε το HP group, το TSA group, το SSA group και το Mix group. Αθροιστικά, οι κατηγορίες 1 και 2 απετέλεσαν την υπερκατηγορία των καλοήθων πολυπόδων (**Ben-t : benign tissue**), ενώ, κατ' αναλογία, οι κατηγορίες 5 και 6 απετέλεσαν αθροιστικά την υπερκατηγορία των φυσιολογικών ιστών πλησίον των καλοήθων πολυπόδων (**Ben-Nn : benign normal near**). Τέλος, ενώσαμε τις Ben-Nf με τις απομακρυσμένες φυσιολογικές περιοχές από τις δύο ομάδες ασθενών (ca-free + ca-bearing) σε μία υπερκατηγορία (**Normal Far tissues globally**).

Η κατηγορία 5 υπερκατηγοριοποιήθηκε (ενώσαμε δηλαδή τις Aden-Nn από τις δύο ομάδες ασθενών σε μία ενιαία κατηγορία), αλλά και υποκατηγοριοποιήθηκε (διαχωρίσαμε δηλαδή τις Aden-Nn ανάλογα με το εάν ο παρακείμενος ιστός έφερε χαμηλόβαθμη ή υψηλόβαθμη δυσπλασία σε LGD-Nn και HGD-Nn περιοχές αντίστοιχα).

Οι πιο πάνω συμβολισμοί χρησιμοποιήθηκαν καθόλη τη διάρκεια της μελέτης και αφορούσαν τόσο τα ιστικά δείγματα όσο και τις ιστικές περιοχές. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε ούτε μία περίπτωση, στην οποία τα δύο ιστικά δείγματα συγκεκριμένης ιστικής περιοχής που κατευθύνθηκαν για διαγνωστικό έλεγχο, να παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους ως προς την ιστολογική διάγνωση.

8. Μεθοδολογία απομόνωσης του DNA

Στη συνέχεια, και εφόσον είχαμε γνώση της ιστολογικής διάγνωσης σε κάθε ιστικό δείγμα χωριστά, ελάμβανε χώρα η απομόνωση γενωμικού DNA από παραφίνη στο σύνολο των 334 ιστικών δειγμάτων.

Θεωρητικά, για να απομονώσουμε καθαρό DNA από τις τομές, έπρεπε να ακολουθήσουμε έξι βασικά βήματα :

- 1^ο Οι ιστολογικές τομές έπρεπε να αποπαραφινωθούν : χρήση ξυλόλης και αιθανόλης.
- 2^ο Τα κύτταρα έπρεπε να λυθούν και να απελευθερωθούν οι πυρήνες, οι οποίοι έπρεπε , ομοίως, να λυθούν: χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε χημικό παράγοντα με απορρυπαντική ικανότητα.
- 3^ο Οι κυτταρικές πρωτεΐνες έπρεπε να αποδομηθούν με την επίδραση ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η πρωτεΐνάση K.
- 4^ο Έπρεπε να αντιστραφεί η επίδραση της παραμένουσας φορμαλδεΐδης στα νουκλεϊνικά οξέα, δηλαδή η συσσωμάτωσή τους με πρωτεΐνες : επιτυγχάνετο με θέρμανση στους 90° C.
- 5^ο Το DNA έπρεπε να διαχωριστεί από τις πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα ιστικά και κυτταρικά υπολείμματα : χρησιμοποιήθηκαν αιθανόλη 100% και διαλύματα αλάτων.
- 6^ο Το DNA έπρεπε να ανασυσταθεί : χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ανασύστασης ή έκλουσης TE (Tris-EDTA).

Η διαδικασία συνήθως διαρκούσε δύο ημέρες. Οι ενέργειες της πρώτης ημέρας ξεκινούσαν με την **αποπαραφίνωση** των δειγμάτων : αρχικά προστίθετο 1000 μl ξυλόλης στο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης (περιείχε ιστολογικές τομές πάχους 5-8 μ), ακολουθούσε έντονη ανάδευση του διαλύματος (vortex) και, μετά, η επώαση του eppendorf στους 56° C για 5 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου (13.400 rpm για 3 λεπτά στους 15-25° C) και αμέσως μετά απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα με πιπέτα, με μεγάλη προσοχή, ούτως ώστε να μην απομακρύνουμε τμήμα του ιζήματος. Για να λιώσει όλη η παραφίνη επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία 1 ή 2 φορές. Στη συνέχεια προσθέταμε 1000 μl αιθανόλης 96-100% στο ίζημα, ώστε να απομακρυνθεί η υπόλοιπη ξυλόλη, αναμειγνύαμε ελαφρά με vortex και φυγοκεντρούσαμε με τις ίδιες συνθήκες (13.400 rpm, 3 λεπτά, 15-25° C). Μετά απομακρύνουμε την αιθανόλη με τη πιπέτα, προσέχοντας να μην απομακρύνουμε το ίζημα. Ακολουθούσε επανάληψη της διαδικασίας με αλκοόλη άπαξ. Στο τέλος της δεύτερης σειράς πλύσης με αιθανόλη αφήναμε το σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης ανοικτό στους 37° C τουλάχιστον για 15 -20 λεπτά περίπου (πρακτικά μέχρι να εξατμιστεί ολόκληρη η αιθανόλη).

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η **λύση** των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών. Αυτό γινόταν εφικτό με την επαναιώρηση του προκύπτοντος ιζήματος με προσθήκη 180 μL ρυθμιστικού διαλύματος ATL (tissue lysis buffer) στο σωληνάριο eppendorf. Το διάλυμα ATL είναι ρυθμιστικό, βοηθώντας τη δράση της πρωτεΐνάσης K που θα ακολουθούσε. Περιέχει απορρυπαντικό SDS (δωδεκανικόθειϊκό νάτριο), το οποίο έχει λιποδιαλυτή δράση, συνδέεται με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών, μειώνει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, αποδιατάσει και διασπά τις μεμβράνες, επιβραδύνει τη δράση των νουκλεασών και παράλληλα συντελεί στην κατακρήμνιση των νουκλεοπρωτεϊνών¹⁶⁸.

Στην πορεία ακολουθούσε η **αποδόμηση-μετουσίωση των πρωτεϊνών** : προθέταμε 40 μL πρωτεΐνάσης K, με σκοπό την απομάκρυνση των μεμβρανικών πρωτεϊνών και όσων πρωτεϊνών είναι συνδεδεμένες με το DNA (χρωματίνη). Ακολούθως, αναδεύαμε το διάλυμα με vortex. Επειδή η πρωτεΐνάση K έχει μέγιστη ενεργότητα στους 56 ° C, διάλυμα και ιστός επωαζόταν σε υδατόλουτρο 56 ° C όλη τη νύκτα, ώστε να διαλυθεί το ιστικό δείγμα.

Την επόμενη ημέρα, η πρώτη μας μέριμνα ήταν να ελέγξουμε εάν η πρωτεΐνάση K είχε διαλύσει τον ιστό εξ' ολοκλήρου. Εάν το αποτέλεσμα δεν ήταν το απολύτως επιθυμητό, προσθέταμε επιπλέον 20-60 ml πρωτεΐνάσης K (αναλόγως του μεγέθους και της προέλευσης των ιστοτεμαχιδίων) και περιμέναμε μέχρι την πλήρη διάλυση του ιστού και την ανάδειξη διαυγούς ομοιογενούς διαλύματος. Παράλληλα με τη δράση της πρωτεΐνάσης K θερμαίναμε το υδατόλουτρο στους 90° C. Με το υδατόλουτρο να βρίσκεται για λίγη ώρα στη θερμοκρασία των 90° C, το erppendorf εμβαπτιζέτο στον οικείο υποδοχέα του υδατόλουτρου για 1 ώρα. Η θερμοκρασία αυτή σε συνδυασμό με το ρυθμιστικό διάλυμα ATL, αντιστρέφει ικανοποιητικά την τροποποίηση των νουκλεϊκών οξέων από τη φορμαλδεΰδη. Μετά φυγοκεντρούσαμε συντόμως το σωληνάριο για να απομακρύνουμε τα σταγονίδια από το πώμα και το αφήναμε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου πριν προχωρήσουμε. Η εξασφάλιση καθαρού DNA χωρίς RNA γινόταν με προσθήκη 4 µL RNase A, επαρκή ανάμιξη και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.

Ακολουθούσε προσθήκη 200 µL ρυθμιστικού διαλύματος AL και πολύ καλή ανάμιξη των συστατικών του διαλύματος με ανακίνηση σε αναδευτήρα vortex. Το διάλυμα λύσης AL βοηθούσε να λυθούν τα διάφορα ιστικά και κυτταρικά υπολείμματα. Μετά, προσθέταμε άμεσα 200 µL διαλύματος αιθανόλης 96-100% και γινόταν εκ νέου πολύ καλή ανάμιξη με αναδευτήρα vortex. Η προσθήκη αυτή ελάμβανε χώρα, επειδή, όταν το DNA είναι σε αιθανόλη, ξετυλίγεται και καθιζάνει αφήνοντας πίσω τα άλλα κυτταρικά συστατικά, που δεν είναι διαλυτά σε αιθανόλη. Τέλος φυγοκεντρούσαμε συντόμως το σωληνάριο, για να απομακρύνουμε τα σταγονίδια από το εσωτερικό του καπακιού του σωληναρίου.

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη DNeasy της Qiagen. Με μία πιπέτα το υλικό από το ομογενοποίηση μεταφέρετο ιδιαιτέρως προσεκτικά από το erppendorf σε μία κολώνα έκλουσης του DNA QIAamp MinElute DNeasy Mini spin, η οποία βρίσκεται σε σωλήνα-υποδοχέα των 2 ml. Κατά τη μεταφορά αυτή λαμβάναμε μέριμνα να μην υγραίνουμε το χείλος του σωληναρίου. Με κλειστό το καπάκι, ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 8000 στροφές για 1 λεπτό, πετούσαμε το ομογενοποίηση που βρισκόταν στο σωληνίσκο (περιείχε διάφορες προσμείξεις) και μετά τοποθετούσαμε την κολώνα σε καθαρό σωληνίσκο-υποδοχέα των 2 ml. Σε περίπτωση που το ομογενοποίηση δεν είχε περάσει απόλυτα διά της μεμβράνης (είχε εμφανώς παραμείνει τμήμα αυτού στην κολώνα), επαναλαμβάναμε τη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες.

Ακολουθώς ανοίγαμε προσεκτικά το καπάκι της κολώνας, προσθέταμε 500 µL του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης AW1, χωρίς να υγράνουμε το χείλος του σωληνίσκου, και κλείναμε το καπάκι της κολώνας. Μετά τη φυγοκεντρούσαμε στις 8.000 rpm για 1 λεπτό, απορρίπταμε το ομογενοποίηση, που περιείχε διάφορες προσμείξεις, και τοποθετούσαμε την κολώνα σε καθαρό υποδοχέα-σωληνίσκο. Με το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης AW2 και χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους (500 µL, 8.000 rpm για 1 λεπτό) ακλουθούσαμε στη συνέχεια ακριβώς τα ίδια βήματα. Τα διαλύματα πλύσης περιείχαν εκτός των άλλων αιθανόλη για τη διατήρηση των νουκλεϊνικών οξέων στη μεμβράνη. Τελικά, ξηραίναμε τη μεμβράνη της κολώνας, φυγοκεντρώντας την στις μέγιστες στροφές (14.000) για 3 λεπτά. Έτσι, απομακρύνουμε και την ελάχιστη αιθανόλη που θα μπορούσε να είχε παραμείνει.

Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των φυγοκεντρήσεων το DNA προσδένετο εκλεκτικά στη DNeasy μεμβράνη της κολώνας, ενώ η έκπλυση με τα ρυθμιστικά διαλύματα εξασφάλιζε την απομάκρυνση των άχρηστων προσμείξεων. Η DNeasy μεμβράνη τελικά μεταφερόταν σε καθαρό μικρό δοκιμαστικό σωλήνα 1,5 ml. Τα καθαρά μόρια DNA που περιείχε η μεμβράνη εκλούονταν με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (διάλυμα ανασύστασης) ATE ή AE (20-100 µL, συνήθως 30-50 µL). Το διάλυμα αυτό ετοποθετείτο με μικρή πιπέτα πολύ προσεκτικά ακριβώς επί του κέντρου της μεμβράνης. Το διάλυμα έκλουσης έχει συγκέντρωση 10 mM

Tris Cl και 0,5 mM EDTA. Ο ρόλος του EDTA είναι να προστατεύει το DNA, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα, όπως το Mg^{2+} και το Ca^{2+} , απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών που διασπούν το DNA. Μετά κλείναμε προσεκτικά το καπάκι. Ο συνδυασμός του ιδιαίτερα αλκαλικού pH (pH=9) του διαλύματος έκλουσης με την επώαση της κολώνας επί 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (15-25° C) και τη φυγοκέντρωσή της σε 14.000 rpm επί 3 λεπτά οδηγούσε σε αποδέσμευση του DNA από τη μεμβράνη. Συνεπώς, το καθαρό DNA μεταφερόταν από τη μεμβράνη στην βάση του σωληναρίου erppendorf 1,5 ml υπό μορφή διαλύματος. Το ίδιο αποτέλεσμα εξασφαλιζόταν όταν επωάζαμε τις κολώνες σε 56° C για 10 λεπτά (ATE) ή σε 70° C για 10 λεπτά (AE). Το DNA που ελαμβάνετο από το έκλουσμα υπόκειτο ακριβώς στην ίδια διαδικασία μία φορά ακόμα, για να ελαχιστοποιήσουμε την οποιαδήποτε απώλεια DNA, που ενδεχομένως είχε παραμείνει στη μεμβράνη.

Για όλα τα δείγματα, το έκλουσμα (υδατικό διάλυμα DNA) υποβαλλόταν σε διαδικασία πιστοποίησης της καθαρότητάς του και σε υπολογισμό της συγκέντρωσής του με την οπτικοποίηση σε μηχανήμα φωτομέτρησης υπεριώδους ακτινοβολίας (ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση με φωτομέτρηση). Συγκεκριμένα, ο λόγος απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας στα 260 nm (A260) προς την απορρόφηση στα 280 nm (A280) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις περί το 1,8, δηλωτικός της καθαρότητας του DNA στο διάλυμα^{168,169}.

Επίσης γινόταν έλεγχος της ακεραιότητας του DNA. Για το λόγο αυτό στα υδατικά διαλύματα DNA εφαρμοζόταν συστηματικά το **πρωτόκολλο της ιντερφερόνης-γ**, μιας ουσίας για την οποία η πληροφορία βρίσκεται σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα και η ανίχνευση του γονιδίου της επιβεβαιώνει ότι το απομονωθέν DNA, δεν έχει κατακερματισθεί (βλέπε παράρτημα, πρωτόκολλο 1, σελίδα 134). Το πρωτόκολλο απαιτούσε την ανάμιξη του υπό εξέταση δείγματος καθώς και δύο επιπλέον μαρτύρων ελέγχου (ενός θετικού και ενός αρνητικού) με water for injection (WFI), με υδατικό διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων στο οποίο τα 4 dNTPs είχαν την ίδια αναλογία, με ρυθμιστικό διάλυμα, με ειδικούς για το γονίδιο της ιντερφερόνης εκκινητές (primer Fw και primer Rv), με την απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό DNA πολυμεράση καθώς και τον συμπάραγοντα για τη δράση της πολυμεράσης ($MgCl_2$). Δεν απαιτείτο ειδικός μάρτυρας συγκεκριμένου μοριακού βάρους (ladder) να τρέξει μαζί με το γονίδιο της ιντερφερόνης, διότι η μέθοδος ελέγχου είναι ποιοτική. Ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση των διαλυμάτων που προέκυπταν σε πηκτική αгарόζης και στη συνέχεια οπτικοποίηση της πηκτής σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η **πηκτική αгарόζης** παρασκευαζόταν με σκόνη αгарόζης, νερό, τρις-βορικό EDTA (TBE) και βρωμιούχο αιθίδιο. Για τον καλό διαχωρισμό των υπό μελέτη τμημάτων DNA, τα πηκτώματα αгарόζης παρασκευαζόταν με τελική συγκέντρωση 2%, επειδή με τη συγκέντρωση αυτή επιτυγχάνεται καλή ανάλυση των μικρών τεμαχίων DNA που αφορούσαν στο υπό εξέταση υλικό (0,1-2 kb).

Εν τέλει, το DNA που ήταν διαλυμένο στο σωληνάριο erppendorf 1,5 ml μεταφερόταν πολύ προσεκτικά σε ακόμη μικρότερο erppendorf (1 ml) και αποθηκεύετο κωδικοποιημένο σε θερμοκρασία -20° C. Αυτό γίνεται γιατί το DNA που ενυδατώνεται με νερό (το DNA είναι υδατοδιαλυτό) υπόκειται σε υποβάθμιση από όξινη υδρόλυση στο πέρασμα του χρόνου¹⁶⁸.

Για όλα τα δείγματα ελαμβάνετο μέριμνα και διατηρούσαμε τις κολώνες στις ίδιες συνθήκες με το διάλυμα του απομονωμένου DNA (-20° C), χρησιμοποιώντας μάλιστα και τον ίδιο κωδικό του μέλους. Υπήρχαν δύο λόγοι που δεν απορρίπταμε τις κολώνες : αφενός μεν υπήρχε το ενδεχόμενο να έχουν αποφραχθεί τα μικροσκοπικά σφαιρίδια που αποτελούν τη μεμβράνη, λόγω ενδεχόμενης αφθονίας του υλικού και το DNA να παρέμενε στη μεμβράνη και όχι στο έκλουσμα, αφετέρου δε υπήρχε η περίπτωση κάποιο από τα πολλά στάδια να είχε προχωρήσει με αποκλίσεις ως προς την ορθότητά του, οπότε το συσσωμάτωμα που παίρναμε στο τελικό έκλουσμα να ήταν αναγκαίο να «ξαναπεράσει» από την κολώνα.

9. Μεθοδολογία ανίχνευσης των μεταλλάξεων στο K-ras

Προκειμένου να γίνει ο έλεγχος των πιθανών μεταλλάξεων του K-ras, το DNA που είχε απομονωθεί σε υδατικό διάλυμα, επολλαπλασιάζετο με τη μέθοδο της **αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)**. Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οροθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Συνήθως, το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται για ενζυμικό πολλαπλασιασμό με την PCR είναι μεταξύ 100-1000 bp. Το δεύτερο εξόνιο του γονιδίου K-ras έχει μέγεθος 160 bp.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τυπικά 25-40 θερμικούς κύκλους (συνήθως 30) και διενεργείται σε ξερούς επωαστήρες που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές. Κάθε θερμικός κύκλος αποτελείται από 3 στάδια :

1° στάδιο : αποδιάταξη του εκμαγείου του DNA στους 94-96° C για 20-60 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό το DNA-στόχος επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία, ώστε οι έλικες-στόχοι να τήκονται και να διαχωρίζονται, ούτως ώστε να μπορούν να υβριδοποιηθούν με εκκινητές,

2° στάδιο : σύνδεση-υβριδισμός των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες στους 50-65° C για 20-60 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κατεβαίνει, για να μπορέσουν οι εκκινητές να συνδεθούν με τις συμπληρωματικές αλυσίδες-στόχους, και τέλος,

3° στάδιο : επέκταση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA, με κατεύθυνση της νεοσχηματιζόμενης έλικας από 5' προς 3', στους 72° C για 0,5 - 2 λεπτά. Εδώ απαιτείται η δράση της DNA πολυμεράσης. Στο τέλος της αντίδρασης, σε ένα ξεχωριστό στάδιο, ο θερμικός κυκλοποιητής μπορεί να διατηρήσει τα δείγματα σε χαμηλή θερμοκρασία (4-18° C) μέχρι να αποθηκευθούν ή να υποστούν επεξεργασία.

Στην PCR το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή από τον πρώτο κύκλο αποτελεί εκμαγείο για τον εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Οι αντιδράσεις επέκτασης κάθε εκκινητή απολήγουν σε διάφορες αποστάσεις από τον εκκινητή, με αποτέλεσμα προϊόντα πολλαπλασιασμού που περιέχουν αντίθετες έλικες DNA απροσδιορίστου μεγέθους. Μετά το δεύτερο κύκλο όμως αρχίζει να συσσωρεύεται ένα ειδικό προϊόν πολλαπλασιασμού, που γίνεται γρήγορα το κυρίαρχο (PCR amplicon). Το προϊόν αυτό εξαρτάται από τους δύο εκκινητές και αναφέρεται στην αλληλουχία στόχος, εν προκειμένω στο υπό μελέτη γονίδιο.

Η θερμοάνοτη Taq πολυμεράση είναι ο σημαντικότερος παράγοντας της αντίδρασης του ενζυμικού πολλαπλασιασμού. Είναι ένζυμο, που διαθέτει 5' προς 3' εξωνουκλεοτιδική δράση, μπορεί να συνθέσει 800 bp ανά λεπτό και έχει διάρκεια ημίσειας ζωής περίπου 40 λεπτά στους 95° C, αντέχοντας την επαναλαμβανόμενη υψηλή θερμοκρασία. Παρόλα αυτά, το ένζυμο είναι ευαίσθητο σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό το χειριζόμαστε με ιδιαίτερη προσοχή : το αποθηκεύουμε στη θερμοκρασία των -20° C, στην οποία δεν στερεοποιείται, όταν ψύχεται, λόγω της παρουσίας γλυκερόλης εντός του διαλύματος της. Επίσης, την βγάζουμε από τους -20° C λίγο πριν τη χρησιμοποιήσουμε, τη διατηρούμε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το συντομότερο δυνατόν και την προσθέσουμε τελευταία από όλα τα άλλα συστατικά στο διάλυμα¹⁶⁸.

Σημαντικός παράγοντας είναι και η συγκέντρωση της πολυμεράσης. Πολύ ψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε πολλαπλασιασμό παραπροϊόντων, ενώ πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οδηγούν σε παραγωγή λιγότερου προϊόντος¹⁶⁸. Στο πρωτόκολλό μας επιλέξαμε αρχικό όγκο πολυμεράσης 0,2 μL, με αρχική συγκέντρωση 5 U/ μL.

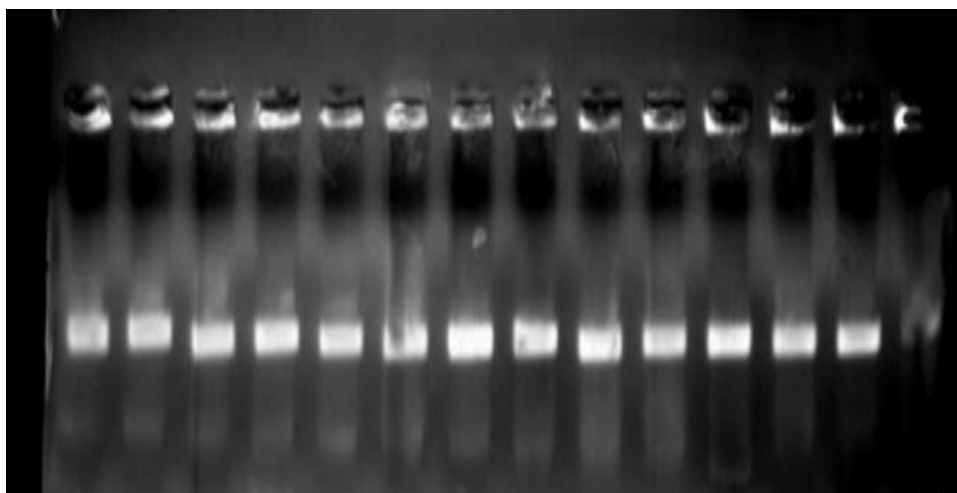
Στην έρευνά μας χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της διπλής ή εμφωλεύουσας (nested) PCR. Η συγκεκριμένη παραλλαγή περιλαμβάνει δύο συνεχόμενες αντιδράσεις PCR με 25 περίπου κύκλους η κάθε μία. Το πλεονέκτημά της είναι η κατακόρυφη αύξηση των αντιγράφων του DNA στόχου (ο οποίος στην προκειμένη έρευνα είναι το γονίδιο K-ras) και η ιδιαίτερα αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητά της ¹⁶⁸. Η εμπλουτισμένη αυτή τεχνική PCR έχει τόσο μεγάλη ευαισθησία όσον αφορά την ανίχνευση μεταλλάξεων στο K-ras, που μπορεί να ανακαλύψει ένα μεταλλαγμένο αλλήλιο, ακόμα και όταν αυτό βρίσκεται ανάμεσα σε 10.000 φυσιολογικά αλλήλια ¹⁷⁰.

Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιείται ένα εξωτερικό ζεύγος εκκινητών που περικλείει την ευρύτερη περιοχή που πρόκειται να μελετηθεί. Το PCR προϊόν της πρώτης αυτής αντίδρασης χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη δεύτερη αντίδραση PCR που ακολουθεί σε δεύτερο σωληνάριο και περιλαμβάνει δύο εσωτερικούς εκκινητές ειδικούς ως προς κάποιο τμήμα της πρώτης πολλαπλασιασμένης αλληλουχίας. Με τη μέθοδο αυτή αυξάνεται η ευαισθησία και η ειδικότητα της αντίδρασης.

Στην πρώτη αντίδραση (πρωτόκολλο RAS A/B) χρησιμοποιήθηκε εξωτερικό ζεύγος εκκινητών (RASA και RASB), όπως φαίνεται στο πρωτόκολλο 2 του παραρτήματος στη σελίδα 135. Η διαδικασία ξεκινούσε με την παρασκευή του κεντρικού μείγματος αντίδρασης (mastermix), το οποίο, εκτός από τους εκκινητές (primers), περιείχε WFI (water for injection), ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα των 4 δεοξυνουκλεοτιδίων σε ίση αναλογία, τον συμπαραγοντα της πολυμεράσης MgCl₂, και την Taq πολυμεράση. Το mastermix διαιρείτο σε ισόποσους όγκους, ίσους αριθμητικά με το άθροισμα του αριθμού των υπό εξέταση δειγμάτων ενός αρνητικού control και δύο θετικών control (ένα για τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 και ένα για τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13).

Το τελικό στάδιο ελάμβανε χώρα πλησίον της συσκευής της PCR. Αποψύχαμε τα διαλύματα απομονωμένου DNA και από αυτά μεταφέραμε προσεκτικά, με ειδική μικροπιπέτα, 0,5 μL διαλύματος απομονωμένου DNA σε κάθε erppendorf, που περιείχε τμήμα του mastermix. Ακολούθως τοποθετούσαμε τα erppendorfs με τα προκύπτοντα υδατικά διαλύματα DNA στις ειδικές θήκες του κυκλοποιητή και θέταμε σε λειτουργία το αντίστοιχο πρωτόκολλο (RAS A/B) στον κυκλοποιητή, πατώντας τον ειδικό διακόπτη. Με τη διαδικασία αυτή, το DNA εκκινούσε τον ενζυμικό του πολλαπλασιασμό. Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός ξεκινούσε συνήθως λίγο πριν το πέρας των εργασιών του εργαστηρίου, διαρκούσε περίπου 3-4 ώρες, και μετά την ολοκλήρωσή του ο θερμικός κυκλοποιητής διατηρούσε τα προϊόντα του σε χαμηλή θερμοκρασία (4-18° C) μέχρι την επόμενη ημέρα, οπότε και ξεκινούσε η δεύτερη αντίδραση PCR. Σε περίπτωση που η ολοκλήρωση γινόταν σε εργάσιμες ώρες, τα PCR products μεταφέρονταν και διατηρούνταν στο ψυγείο (θερμοκρασία συντήρησης), μέχρι να ξεκινήσει η δεύτερη αντίδραση PCR.

Πριν, κατά και μετά από τη διαδικασία, λαμβάναμε όλα τα μέτρα για την αποστείρωση του ειδικού χώρου παρασκευής των δειγμάτων (hood) από ενδεχόμενες επιμολύνσεις των δειγμάτων με γενετικό υλικό από το περιβάλλον (χρησιμοποιούσαμε ειδικά απολυμαντικά, το προσωπικό φορούσε ειδικές μάσκες προσώπου και εφαρμόζαμε υπεριώδη ακτινοβολία). Επίσης λαμβάναμε μέριμνα να μην μεταφέρουμε τα δείγματα DNA στο χώρο της hood. Επίσης, για να αποφύγουμε την περιβαλλοντική επιμόλυνση ή την επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων λαμβάναμε προφυλάξεις. Όταν τοποθετούσαμε τα διαλύματα στο θερμικό κυκλοποιητή χρησιμοποιούσαμε ειδική πιπέτα μόνο για τη φόρτωση του DNA στα erppendorfs. Ξεκινούσαμε τη φόρτιση πάντοτε από τον αρνητικό μάρτυρα, το erppendorf δε του αρνητικού μάρτυρα δεν το αγγίζαμε ούτε το μετακινούσαμε μέχρι να κλείσει το καπάκι του κυκλοποιητή. Τέλος, αλλάζαμε το ρύγχος της πιπέτας κατά τη φόρτιση των διαφορετικών διαλυμάτων DNA σε κάθε erppendorf ξεχωριστά.



Διαγνωστική εικόνα 1 : Έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η παρουσία των άπεπτων K-ras στο πήκτωμα αγαρόζης εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα της PCR.

Η δεύτερη αντίδραση PCR (πρωτόκολλο RAS A/C) περιελάμβανε δύο εκκινητές ειδικούς ως προς εσωτερικό τμήμα της πρώτης πολλαπλασιασμένης αλληλουχίας, η οποία φέρει τα κωδικόνια 12 και 13 προς εξέταση (βλέπε παράρτημα, πρωτόκολλο 3, σελίδα 135). Η διαδικασία δεν διέφερε επί της αρχής από την αρχική. Στο τέλος, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και η οπτικοποίηση στην τράπεζα της υπεριώδους ακτινοβολίας (διαγνωστική εικόνα 1), επιβεβαίωσε ότι είχαν παραχθεί άπεπτα προϊόντα μικρού σχετικά μήκους (περίπου 150-200 bp), και ήταν εφικτή η μετάβαση στο επόμενο βήμα. Το τελικό προϊόν (PCR amplicon) της αντίδρασης ήταν το άπεπτο πρωτοογκογονίδιο ή το ογκογονίδιο K-ras. Σε περίπτωση που η αντίδραση ολοκληρωνόταν σε μη εργάσιμες ώρες, τα PCR products (RAS A/C) μεταφέρονταν και διατηρούνταν στο ψυγείο (θερμοκρασία συντήρησης). Διαφορετικά, προχωρούσαμε άμεσα στον έλεγχο των K-ras μεταλλάξεων.

Στα PRC amplicons της RAS A/C αντίδρασης γινόταν έλεγχος για πιθανές μεταλλάξεις στο K-ras, με πέψεις με ένζυμα περιορισμού. Χρησιμοποιούντο τα προϊόντα της RAS A/C (PCR amplicons) για τη δημιουργία δύο ξεχωριστών mastermix. Κάθε mastermix περιείχε ένα από τα δύο ένζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά (περιοριστικές ενδονουκλεάσες τύπου II) είναι απολύτως ειδικές στο να τέμνουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία στο DNA και καμία άλλη : το περιοριστικό ένζυμο δρα ως «ψαλίδι-κλειδί» τέμνοντας την υπό εξέταση αλληλουχία -και μόνο αυτή- στη θέση που έχει ορισθεί ως σημείο αναγνώρισης (ειδικό πολυμορφικό σημείο). Στα mastermix και τα αντίστοιχα eppendorfs χρησιμοποιούνταν οι ίδιοι κωδικοί για κάθε δείγμα που είχαμε χρησιμοποιήσει και στο RAS A/C, με εξαίρεση τον αρνητικό μάρτυρα του RAS A/C, ο οποίος δεν «έπρεπε» να φέρει «σήμα» υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η παρουσία σήματος στον αρνητικό μάρτυρα δήλωνε επιμόλυνση με γενετικό υλικό. Σε τέτοια περίπτωση, επαναλαμβάναμε την αντίδραση από την αρχή.

Τόσο στην αντίδραση RAS A/B όσο και στην RAS A/C δεν προηγείτο το πρωτόκολλο της ιντερφερόνης, αφενός μεν επειδή το είχαμε ήδη κάνει στο DNA που είχαμε απομονώσει, αφετέρου δε επειδή ελέγχουμε και τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης επειδή ο κυκλοποιητής πολλαπλασιάζει μικρή ποσότητα DNA σε τεράστια νούμερα, αρκούσε ένας έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης, με «τρέξιμο» 5 μ L από το διάλυμα (είτε από RAS A/B product είτε από RAS A/C product) : η παρουσία εντός 5 λεπτών διακριτών ζωνών στην πηκτή δηλώνει την παρουσία

προϊόντος που δεν είχε κατακερματισθεί, όπως αναφέρθηκε (διαγνωστική εικόνα 1). Συνεπώς η διαδικασία μπορούσε να βαδίσει με ασφάλεια και αξιοπιστία στο επόμενο βήμα.

Το πρώτο mastermix προοριζόταν για την ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 και σχηματιζόταν, εκτός από WFI, από ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (No 3 της New England Biolabs) και από το περιοριστικό ένζυμο *BstX-I*. Το δεύτερο mastermix προοριζόταν ομοίως για την ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 13 και, εκτός από WFI, περιελάμβανε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (No 2 της New England Biolabs) και το περιοριστικό ένζυμο *Xcm-1*.

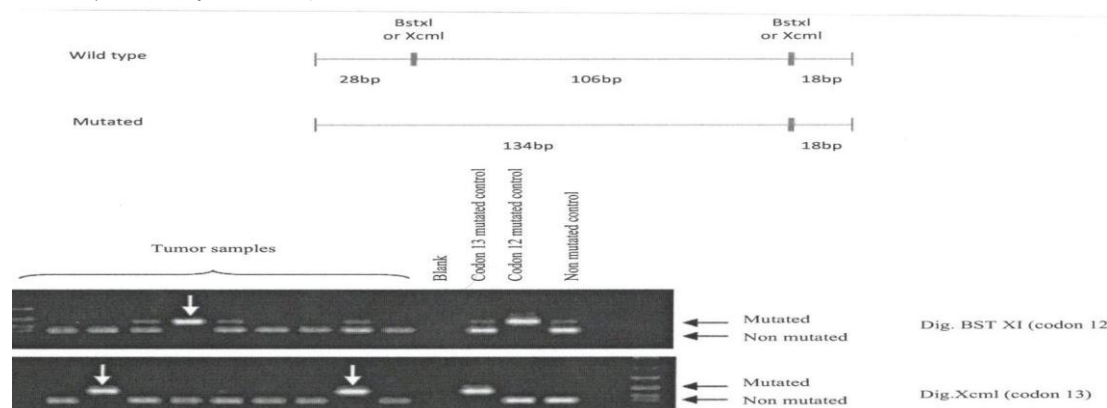
Αφού παρασκευάζονταν τα mastermix, γινόταν ισόποση κατανομή του διαλύματος στα eppendorfs και μετά προστίθετο το προϊόν της 2^{ης} PCR αντίδρασης (5μL σε κάθε eppendorf). Όταν ολοκληρωνόταν η επώαση των δειγμάτων DNA με τα προαναφερθέντα περιοριστικά ένζυμα στους 37° C για 19 ώρες (συνθήκες απαραίτητες για την ενεργό δράση των ενζύμων), τα θραύσματα του γονιδίου του *K-ras* (τμήματα DNA μικρού μήκους, αποτέλεσμα της πέψης του γονιδίου από τα ένζυμα περιορισμού, εφόσον υπήρχε μετάλλαξη) ανιχνευόντουσαν με **ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms, πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού θραύσματος)**. Εάν τα δείγματα (μετά τις πέψεις) δεν ηλεκτροφορούντο άμεσα, εψύχοντο σε θερμοκρασία συντήρησης (ψυγείο) και αποψύχονταν (έλιωναν) λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA (5-500 bp), επειδή διαθέτει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα ¹⁶⁸. Το πολυακρυλαμίδιο παρασκευάζεται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου, σε συνδυασμό με γλυκερίνη, TBE, υπερθειικό αμμώνιο και TEMED. Τα διαλύματα με τα υπό εξέταση θραύσματα φορτώνονταν με την κατάλληλη χρωστική φόρτωσης (bromophenol blue) και ακολούθως ηλεκτροφορούντο κάθετα σε σταθερό ηλεκτρικό πεδίο. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαρκούσε ολόκληρη της νύχτα (overnight). Ακολούθως γινόταν οπτικοποίηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορούντο και 3 μάρτυρες. Αρχικά φορτωνόταν ο κατάλληλος μάρτυρας με τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους (MB-ladder), ούτως ώστε να υπάρχει μέτρο σύγκρισης για το μέγεθος των θραυσμάτων. Επίσης τοποθετούσαμε σε ειδικό «πηγαδάκι» άπεπτο-ακέραιο γονίδιο *K-ras*. Επειδή η μέθοδος είναι ποιοτική και όχι ποσοτική και η σύγκριση με το άπεπτο *K-ras* διαγίγνωνσκε τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, ανάλογα και με το περιοριστικό ένζυμο που είχε χρησιμοποιηθεί, δεν ενδιέφερε εάν το άπεπτο *K-ras* ήταν μεταλλαγμένο ή όχι. Κύριος στόχος είναι ο έλεγχος της απόδοσης της πέψης από το ένζυμο περιορισμού. Αυτό που ενδιέφερε ήταν το μήκος του ενζύμου. Για το λόγο αυτό λαμβάναμε τυχαία ένα από τα PCR amplicons της RAS A/C, στο οποίο δεν προσθέταμε κανένα από τα δύο ένζυμα περιορισμού. Τέλος, ένας ακόμη μάρτυρας φορτωνόταν (θετικός μάρτυρας), ανάλογα με το ένζυμο περιορισμού. Έτσι, όταν αναζητούσαμε τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12, ένα δείγμα DNA διαλύματος με τεκμηριωμένη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 έμπαινε στο ειδικό «πηγαδάκι» μαζί με το *BstX-I* (πρωτόκολλο 4 παραρτήματος, σελίδα 136), ενώ όταν αναζητούσαμε τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13, ένα δείγμα DNA διαλύματος με τεκμηριωμένη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 έμπαινε στο ειδικό «πηγαδάκι» μαζί με το *Xcm-1* (πρωτόκολλο 5 παραρτήματος, σελίδα 137).

Η **αναγνώριση-διάγνωση των μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο *K-ras*** προέκυπτε από τις σχετικές αποστάσεις που διένυναν τα θραύσματα του *K-ras* στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Σε περίπτωση μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 (**mt12**), το *BstX-I* πέπτει το εξώνιο 2 σε ένα μόνο πολυμορφικό σημείο, το οποίο βρίσκεται σε βραχεία απόσταση από το 3' άκρο του. Το δείγμα διανύει μικρή απόσταση, λίγο μεγαλύτερη από αυτή που διανύει το δείγμα του

άπεπτου τμήματος (160 bp), επειδή μικρό τμήμα του εξωνίου είχε αποκοπεί. Στην ηλεκτροφόρηση, συνεπώς, υπάρχει μόνο μία ζώνη πέψης, που αντιστοιχεί περίπου σε μήκος DNA 150 bp. Όταν το δείγμα είναι φυσιολογικό (**wt12**), το *BstX-I* πέπτει το εξώνιο 2 σε δύο πολυμορφικά σημεία, κάθε ένα είναι σε βραχεία απόσταση από τα άκρα 5' και 3'. Στην περίπτωση αυτή καταλείπεται τμήμα DNA με μικρότερο μοριακό βάρος. Συνεπώς, το δείγμα «έτρεχε» μακρύτερα, στη ζώνη που αντιστοιχούσε σε μήκος DNA περίπου 90-100 bp. Επειδή, επί παρουσίας της *K-ras* μετάλλαξης σε δεδομένο ιστικό δείγμα, το δείγμα περιέχει κύτταρα τόσο mt12 όσο και wt12, η διάγνωση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 (**mt12**) σε ετίθετο, όταν το υπό εξέταση δείγμα, που είχε επεξεργαστεί με *BstX-I*, είχε δύο ζώνες πέψης. Η πρώτη ήταν πιο κοντά στο σημείο φόρτισης (πηγαδάκια) και αφορούσε σε μήκος DNA 150 bp και αντιστοιχούσε στο τμήμα του δείγματος με μετάλλαξη (mt12) και η δεύτερη ήταν μακρύτερα από την πρώτη, αφορούσε σε μήκος DNA 90-100 bp και αντιστοιχούσε σε τμήμα του δείγματος χωρίς μετάλλαξη (wt12)²⁰² (βλέπε πρωτόκολλο 4 παραρτήματος, σελίδα 136 και διαγνωστική εικόνα 2).



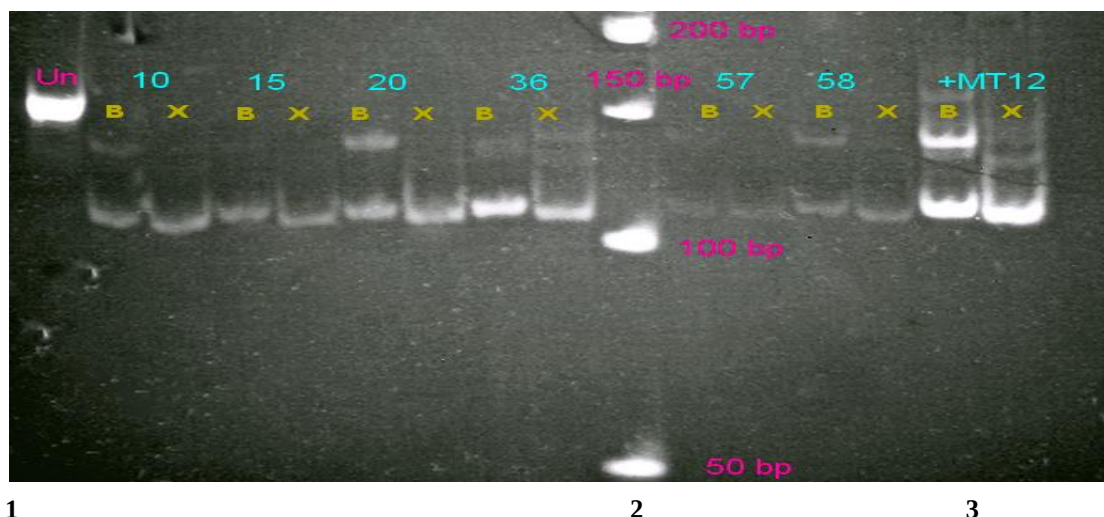
Διαγνωστική εικόνα 2 : Πρότυπη εικόνα αρχείου RFLPs για τη διάγνωση των μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 (*BstX-I*) και 13 (*Xcm-I*) του εξωνίου 2 του *K-ras* (από αναφορά 202).

Τα σημεία πέψης του εξωνίου 2 του *K-ras* με το ένζυμο *Xcm-1* είναι τα ίδια με αυτά που πέπτει το ένζυμο *BstX-I*, τόσο όταν υπάρχει μετάλλαξη στο *K-ras* (mt 13) όσο και όταν το *K-ras* είναι φυσιολογικό (wt)²⁰². Επομένως, η διάγνωση των δειγμάτων με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 (**mt13**) ετίθετο κατ' αναλογία, όταν το υπό εξέταση δείγμα, που είχε επεξεργαστεί με *Xcm-1*, είχε δύο ζώνες πέψης, μία περίπου στα 150 bp (απόσταση κατά την ηλεκτροφόρηση λίγο μεγαλύτερη από αυτή που διένυε το άπεπτο γονίδιο, αντιστοιχούσε στο δείγμα με μετάλλαξη-mt13) και μία στα 90-100 bp (ακόμη μεγαλύτερη απόσταση κατά την ηλεκτροφόρηση, τμήμα του δείγματος χωρίς μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13-wt13) (βλέπε πρωτόκολλο 5 παραρτήματος και διαγνωστική εικόνα 2).

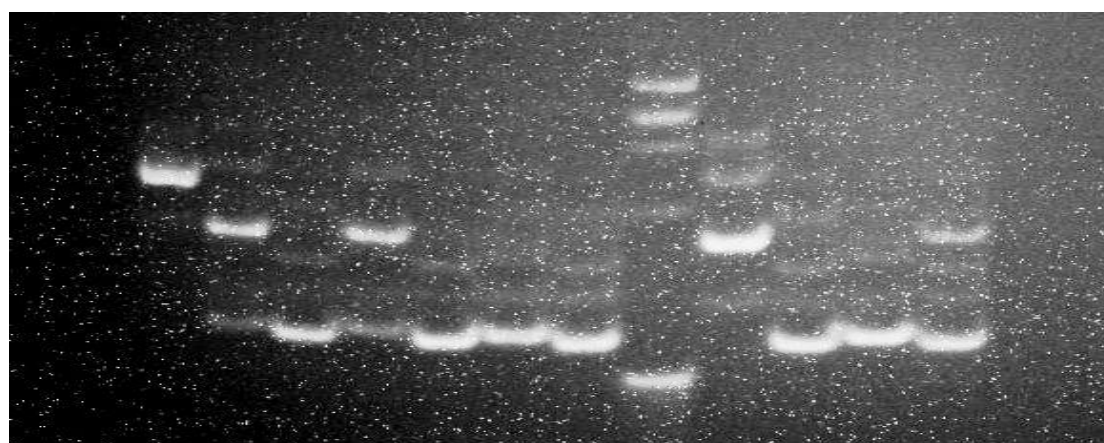
Και στις δύο πιθανές μεταλλάξεις του *K-ras*, η συμφωνία του οπτικού μοντέλου πέψης του δείγματος με την ειδική περιοριστική ενδονουκλεάση με το μέτρο σύγκρισης (το οπτικό μοντέλο πέψης προέκυπτε από την επίδραση της ίδιας ενδονουκλεάσης στον αντίστοιχο θετικό μάρτυρα) ήταν το γεγονός που έθετε τη διάγνωση της μίας (mt12) ή της άλλης (mt13) μετάλλαξης στο υπό εξέταση δείγμα (διαγνωστικές εικόνες 3 και 4).

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε ούτε μία περίπτωση στην οποία τα δύο ιστικά δείγματα μιας συγκεκριμένης ιστικής περιοχής που κατευθύνθηκαν για μοριακό έλεγχο να παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους ως προς το status του *K-ras*.

Μετά και την ολοκλήρωση του μοριακού ελέγχου για *K-ras*, το προφίλ των ασθενών στις 3 οριοθετημένες ομάδες συμπληρώθηκε, με βάση τα δημογραφικά, ενδοσκοπικά, ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά τους, όπως φαίνεται στους πίνακες 3-5.



Διαγνωστική εικόνα 3: Τα προϊόντα της PCR-RFLPs κάποιων περιστατικών της μελέτης, όπως αυτά φάνηκαν στην τράπεζα υπερϊόδους ακτινοβολίας μετά από πέψη με τα περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BstX-I* (B), για τη διάγνωση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 και *Xcm-1* (X), για τη διάγνωση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 13. Τα δείγματα από τις περιπτώσεις 20 και 58 διαγνώστηκαν ως φορείς της μετάλλαξης 12, ενώ τα δείγματα από τις περιπτώσεις 36 και 57 διαγνώστηκαν ως φυσιολογικά για αμφότερα τα κωδικόνια (wt12/wt13). Η θέση 1 αντιστοιχεί στο άπεπτο γονίδιο, η θέση 2 στον MB-ladder και η θέση 3 στο θετικό μάρτυρα για τη μετάλλαξη mt12. Οι ασθενείς με τους κωδικούς 10 και 15 αποκλείστηκαν από τη μελέτη (πληρούσαν τα κριτήρια αποκλεισμού).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Διαγνωστική εικόνα 4: RFLPs. Εικόνα από πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μετά από πέψεις των προϊόντων της PCR με τα δύο περιοριστικά ένζυμα: *BstX-I* (για τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12) and *Xcm-1* (για τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13). Τα τρία ζεύγη (2+3, 4+5 και 9+10) αντιστοιχούν το κάθε ένα σε δείγματα με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12-mt12 (2, 4 και 9), ενώ το κωδικόνιο 13 είναι φυσιολογικό - wt13 (3, 5 και 9). Το επόμενο ζεύγος (6+7) αντιστοιχεί σε ιστό χωρίς μετάλλαξη σε αμφότερα τα κωδικόνια 12 και 13 (wt12/wt13). Το ζεύγος 11+12 αντιστοιχεί σε δείγμα με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 (στήλη 12) -mt13- χωρίς μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12- wt12 (στήλη 11). Η διπλή ζώνη πέψης στη στήλη 12 δηλώνει ότι υπάρχει μίξη των κυττάρων με φυσιολογικό κωδικόνιο 13 (κάτω ζώνη) με αυτά που φέρουν τη μετάλλαξη mt 13 (άνω ζώνη). Ανάλογα αναδεικνύεται η διπλή ζώνη πέψης για μίξη κυττάρων που αφορούν στη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 στις στήλες 2,4 και 9 (στις άνω ζώνες πέψης βρίσκονται τα κύτταρα με τη μετάλλαξη mt 12 και στις κάτω ζώνες πέψης τα κύτταρα με φυσιολογικό κωδικόνιο 12). Στην στήλη 1 φαίνεται το άπεπτο ένζυμο K-ras. Στη στήλη 8 είναι εμφανής η παρουσία του MB-ladder. Στο αριστερό πηγαδάκι του κάθε ζεύγους έχει προστεθεί *BstX-I*, ενώ στο δεξιό *Xcm-1*.

A/A	Κωδ.	Έτη	Φ	Ca-N _F	Serr-t	Aden-N _N	Aden-t	Ben-t	Ca-N _N	Ca	meta-t	Loc
1	7	66	Γ	-	-	-	-	-	wt	mt12	mt12	L
2	66	58	A	-	-	-	-	-	wt	wt	wt	L
3	71	75	A	-	-	-	-	-	wt	wt	wt	L
4	88	79	A	-	-	-	-	-	wt	mt13	mt13	R
5	102	72	Γ	-	-	-	-	-	wt	wt	wt	L
6	108	75	Γ	-	-	-	-	-	wt	wt	wt	L
7	83	70	A	-	-	-	-	-	wt	wt	-	R
8	85	86	A	-	-	-	-	-	wt	mt12	-	R
9	90	78	A	-	-	-	-	-	mt12	mt12	mt12	L
10	103	75	A	-	-	-	-	-	wt	wt	-	L
11	76	75	A	-	wt	-	-	wt	-	wt	-	R
12	14	82	A	wt	-	-	-	-	mt12	mt12	-	R
13	20	73	A	mt 12	-	-	-	-	wt	mt12	-	L
14	24	80	Γ	wt	-	-	-	-	wt	wt	-	R
15	51	62	Γ	wt	-	-	-	-	wt	mt12	-	R
16	1	83	A	wt	-	-	wt	wt	-	wt	-	L
17	49	50	A	wt	-	-	mt12	mt12	wt	wt	-	L
18	57	65	Γ	wt	-	-	wt	wt	mt13	mt12	-	L
19	81	82	A	wt	-	-	wt	wt	mt12	mt12	-	L
20	17	77	A	wt	mt 12	-	-	mt12	wt	mt12	-	L
21	58	78	A	-	wt	wt	wt	wt/wt	wt	mt12	-	R
22	36	73	A	wt	wt	-	-	wt	wt	mt13/ wt	-	L
23	4	71	A	-	wt	-	wt/wt	wt/wt/ wt	-	mt12	-	L
24	19	73	A	wt	-	wt	mt12	mt12	wt	wt	-	L
μ.ο.		73,25										
A/Γ			18/6									
R/L												8/16
mt/T				1/11	1/5	0/2	2/8	3/13	4/21	13/24	3/7	
% mt				9,09	20,00	0,00	25,00	23,07	19,05	54,16	42,85	

Πίνακας 3 : Cancer-bearing bowel (N5). Δημογραφικά, κλινικά, ενδοσκοπικά και γενετικά (ως προς τη μετάλλαξη K-ras) χαρακτηριστικά των ασθενών. wt = περιοχή χωρίς μετάλλαξη στο K-ras, mt 12= περιοχή με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του K-ras, mt 13= περιοχή με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 του K-ras, mt=συνολικές μεταλλάξεις στο K-ras (12 και13). Loc= εντόπιση του καρκίνου στο δεξιό -R- ή στο αριστερό -L- κόλον. mt/T: αναλογία μεταλλαγμένων δειγμάτων προς τα ολικά. A/Γ= άνδρες/γυναίκες.

A/A	Κωδ.	Έτη	Φ	BEN-NF	Serr-t	Serr-NN	Aden-t	Aden-NN	Ben-t	Loc
1	75	59	A	wt	-	-	mt12	-	mt12	R
2	111	47	Γ	-	-	-	wt/wt	/wt	wt/wt	L
3	13	54	Γ	-	-	-	wt/wt	mt12	wt wt	L
4	3	80	A	wt	wt/wt	mt12	wt/mt12	mt12	wt wt wt mt12	L
5	31	50	Γ	-	wt	-	wt	-	wt	L
6	48	70	A	wt	-	-	wt	-	wt	L
7	18	70	Γ	wt	-	-	mt 12	wt	mt 12	R
8	11	62	A	-	-	-	wt	wt	wt	R
9	25	62	Γ	wt	-	-	wt	wt	wt	R
10	9	60	A	wt	-	-	wt	wt	wt	R
11	23	45	A	wt	wt	wt	wt	wt	wt wt	L
12	21	57	Γ	wt	wt	wt	-	-	wt	L
13	28	62	A	wt	wt	wt	-	-	wt	L
14	37	66	Γ	wt	wt	wt	-	-	wt	L
15	38	19	A	wt	wt	wt	-	-	wt	L
16	47	76	A	mt 12	mt12	wt	-	-	mt12	R
μ.ο.	58,68									
A/Γ	9/7									
R/L	6/10									
mt/T	1/12 1/9 1/7 3/14 2/8 4/23									
% mt	8,33 11,11 14,28 21,43 25,00 17,39									

Πίνακας 4 : Cancer-free bowel (N6). Δημογραφικά, κλινικά, ενδοσκοπικά και γενετικά (ως προς τη μετάλλαξη K-ras) χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων. wt = περιοχή χωρίς μετάλλαξη στο ογκογονίδιο K-ras, mt 12= περιοχή με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του K-ras, mt 13= περιοχή με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 του K-ras, mt=συνολικές μεταλλάξεις στο K-ras (12 και 13). Loc= εντόπιση του καλοήθους πολύποδα με την πιο προχωρημένη κατάταξη (προχωρημένο vs μη προχωρημένο) στο δεξιό -R- ή στο αριστερό -L- κόλον. mt/T: αναλογία μεταλλαγμένων δειγμάτων προς τα ολικά. A/Γ= άνδρες/γυναίκες.

A/A	Κωδ.	Φύλο	Έτη	K-ras status δεξιό κόλον	K-ras status αριστερό κόλον	K-ras status ορθό
1	116	Γ	65	wt	wt	wt
2	117	Γ	78	wt	wt	wt
3	118	A	65	wt	wt	wt
4	119	A	43	wt	wt	wt
5	120	Γ	60	wt	wt	wt
6	121	A	61	wt	wt	wt
7	122	Γ	58	wt	wt	wt
8	123	A	65	wt	wt	wt
9	124	A	65	wt	wt	wt
10	125	Γ	58	wt	wt	wt
11	126	A	60	wt	wt	wt
12	127	Γ	65	wt	wt	wt
13	128	A	74	wt	wt	wt
μ.ο. A/Γ		7/6	62,84			
% mt				0	0	0

Πίνακας 5 : Ομάδα ελέγχου (control bowel) (N3). Δημογραφικά, κλινικά, ενδοσκοπικά και γενετικά (ως προς τη μετάλλαξη K-ras) χαρακτηριστικά των υγιών εθελοντών. A/Γ= άνδρες/ γυναίκες.

10. Η στατιστική επεξεργασία και τα πορίσματα των αποτελεσμάτων.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που συλλέχθηκαν διενεργήθηκε με Stata 9.0 (StataCorp, College Station, TX, USA). Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι κατηγορικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως ποσοστά. Το χ^2 test ή το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών. Η τιμή του $p < 0,05$ χρησιμοποιήθηκε ως το κατώφλι για τη στατιστική σημαντικότητα.

Από την λεπτομερή ανάλυση των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα :

1. Η μετάλλαξη στο K-ras δεν σχετιζόταν με το φύλο. Το ανδρικό φύλο υπερτερεί και στις 3 ομάδες συμμετεχόντων: αποτελούσε το 75% των ασθενών του cancer-bearing group, το 56,25% των μελών του cancer-free group και το 53,8 % των υγιών εθελοντών (πίνακες 1, 3-5). Οι ιστοί από νεοπλάσματα του παχέος εντέρου και του ορθού με K-ras μετάλλαξη είναι πιο πιθανό να ανήκουν σε άνδρες από ότι σε γυναίκες : το 77% (10/13) των mt K-ras καρκινικών ιστών, το 80% (4/5) των mt K-ras αδενωμάτων και το 100% (2/2) των οδοντωτών πολυπόδων ανήκαν σε άνδρες (πίνακες 3-4). Παρόλα αυτά, η συχνότητα των K-ras μεταλλάξεων στον καρκινικό ιστό παχέος εντέρου και ορθού δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στα δύο φύλα (όπως φαίνεται στον πίνακα 3, 10/18 άνδρες με ΚΠΕΟ και 3/6 γυναίκες με ΚΠΕΟ έφεραν τη μετάλλαξη στον καρκινικό τους ιστό, Fisher exact test, $p=1$). Ανάλογα δεδομένα προέκυψαν και για τις K-ras μεταλλάξεις στον αδενωματώδη ορθοκολικό ιστό : η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών είναι ίδια στα δύο φύλα (τέσσερις από τους 14 άνδρες με αδενώματα και μία από τις 8 γυναίκες με αδενώματα έφεραν τη μετάλλαξη, πίνακες 3-5, Fisher exact test, $p=0,61$).

2. Η μετάλλαξη στο K-ras δεν σχετιζόταν με την ηλικία. Τα άτομα στο cancer-bearing group έχουν μέσο όρο ηλικίας 73,25 έτη ($\pm 8,3$ έτη), στατιστικά μεγαλύτερο σε σχέση τόσο με τα άτομα του cancer-free group (μ.ο. 58,68 $\pm 14,3$ έτη), $p<0,001$) όσο και με τα άτομα του control group (μ.ο. 62,84 έτη - $p<0,001$). Το cancer-free group έχει στατιστικά όμοιο μέσο όρο ηλικίας με την ομάδα ελέγχου, η οποία αντιπροσωπεύει εν δυνάμει το γενικό πληθυσμό ($p=0,36$). Επιπλέον, η μέση ηλικία 74,7 έτη ($\pm 7,2$ έτη) των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο, οι οποίοι έφεραν την μετάλλαξη K-ras στον καρκινικό τους ιστό ($n=13$), ήταν πολύ κοντά στη μέση ηλικία 71,4 έτη ($\pm 9,5$ έτη) των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο που δεν έφεραν την μετάλλαξη K-ras στον καρκινικό τους ιστό ($n=11$), μεγέθη που δεν διέφεραν σημαντικά ($p>0,05$). Τέλος, αλλά εξίσου σημαντικό, τα ποσοστά της K-ras μετάλλαξης δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα σε κάθε φυσιολογική και νεοπλασματική ιστική περιοχή παχέος εντέρου ή ορθού, που ανήκε σε ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών, σε σχέση με την αντίστοιχη φυσιολογική και νεοπλασματική περιοχή, που ανήκε σε ασθενείς ηλικίας 60 ετών ή λιγότερο (πίνακας 6). Τα ηλικιακά δεδομένα των ασθενών της έρευνάς μας με ορθοκολικό καρκίνο συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, αν και ο μ.ο. εμφάνισης του καρκίνου στην έρευνά μας (73,25 έτη) βρίσκεται λίγο υψηλότερα από τον μ.ο. της βιβλιογραφίας (68-69 έτη)^{31,171}. Αναλυτικά δεδομένα καταγράφονται στους πίνακες 1,3-5 και 6.

	mt K-ras	wt K-ras	Ποσοστό της K-ras μετάλλαξης
1 Αριθμός ασθενών με ηλικία 60 έτη ή λιγότερο. (P1=10)	3	7	30,00 %
2 Αριθμός ασθενών πάνω από τα 60 έτη(P2=30). <u>1 vs 2, p=0,28</u>	16	14	53,33 %
3 Φυσιολογικά δείγματα σε ασθενείς 60 ή λιγότερο.	1	14	6,67 %
4 Φυσιολογικά δείγματα σε ασθενείς πάνω από 60. <u>3 vs 4, p=0,43</u>	8	38	21,05 %
5 Νεοπλασματικά δείγματα σε ασθενείς 60 ή λιγότερο.	4	11	26,67 %
6 Νεοπλασματικά δείγματα σε ασθενείς πάνω από 60. <u>5 vs 6, p=0,38</u>	21	31	46,15 %
7 Φυσιολογικά δείγματα σε ασθενείς 60 ή λιγότερο (Ca-bearing).	0	3	0,00 %
8 Φυσιολογικά δείγματα σε ασθενείς πάνω από 60 (Ca-bearing). <u>7 vs 8, p=1</u>	5	26	16,12 %
9 Φυσιολογικά δείγματα σε ασθενείς 60 ή λιγότερο (Ca-free).	1	11	8,33 %
10 Φυσιολογικά δείγματα σε ασθενείς πάνω από 60 (Ca-free). <u>9 vs 10, p=0,6</u>	3	12	20,00 %
11 Νεοπλασματικά δείγματα από ασθενείς 60 ή λιγότερο (Ca-bearing).	1	3	25,00 %
12 Νεοπλασματικά δείγματα από ασθενείς πάνω από 60 (Ca-bearing). <u>11 vs 12, p=0,62</u>	18	22	45,00 %
13 Νεοπλασματικά δείγματα από ασθενείς 60 ή λιγότερο (Ca-free).	3	8	27,27 %
14 Νεοπλασματικά δείγματα από ασθενείς πάνω από 60 (Ca-free). <u>13 vs 14, p=1</u>	3	9	25,00 %
15 Δείγματα από ασθενείς 60 ή λιγότερο (Ca-bearing).	1	6	14,28 %
16 Δείγματα από ασθενείς πάνω από 60 (Ca-bearing). <u>15 vs 16, p=0,42</u>	24	48	33,33 %
17 Δείγματα από ασθενείς 60 ετών ή λιγότερο (Ca-free).	4	19	17,39%
18 Δείγματα από ασθενείς πάνω από 60 (Ca-free). <u>17 vs 18, p=0,73</u>	6	21	22,22 %
19 Δείγματα από ασθενείς 60 ετών ή λιγότερο.	5	25	16,67 %
20 Δείγματα από ασθενείς πάνω από 60. <u>19 vs 20, p=0,23</u>	29	69	29,59 %

Πίνακας 6: Ηλικία και K-ras μετάλλαξη. Σύγκριση μεταξύ των ορθοκολικών ιστικών δειγμάτων που ελήφθησαν από άτομα (ασθενείς ή όχι) ηλικίας άνω των 60 ετών σε σχέση με αυτές που ελήφθησαν από άτομα (ασθενείς ή όχι) ηλικίας 60 ετών ή λιγότερο. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των μελών του cancer-free group και αυτών του cancer-bearing group. Σε όλες τις υποκατηγορίες που εξετάστηκαν η όποια διαφορά στο ποσοστό της K-ras μετάλλαξης δεν παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα ($p>0,05$) : **οι μεταλλάξεις στο K-ras δεν έχουν σχέση με την ηλικία.**

3. Η μετάλλαξη στο K-ras δεν σχετιζόταν με την εντόπιση της νεοπλασίας. Στο σύνολο των συμμετεχόντων της μελέτης μας, τόσο οι οδοντωτοί πολύποδες όσο και οι καρκίνοι ήταν περισσότεροι στο αριστερό -L- σε σχέση με το δεξιό -R- κόλον (L/R=12/2 και 16/8 αντίστοιχα), σε αντίθεση με τα αδενώματα, τα οποία υπερείχαν στο δεξιό κόλον (L/R=10/12), πίνακες 2-5 και 8. Αυτές οι διαφορές όμως δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Όσον αφορά το K-ras status των καλοήθων νεοπλασμάτων, δεν υπάρχει διαφορά στη συχνότητα ανίχνευσης των K-ras μεταλλάξεων ανάμεσα στα αδενώματα του αριστερού σε σχέση με αυτά του δεξιού κόλου (2/10 αδενώματα του αριστερού κόλου και 3/12 αδενώματα του δεξιού κόλου έφεραν τη μετάλλαξη, $p=1$), στις οδοντωτές αλλοιώσεις του αριστερού με αυτές το δεξιό κόλον (2/12 στο αριστερό κόλον, 1/2 στο δεξιό κόλον έφεραν τη μετάλλαξη, πίνακες 3,4, $p=1$) και στο σύνολο των καλοήθων πολυπόδων (4/22 πολύποδες στο αριστερό κόλον και 4/14 στο δεξιό κόλον έφεραν τη μετάλλαξη, $p=1$) (πίνακες 2-5 και 8). Στο ca-free group, οι πολύποδες του αριστερού κόλου υπερέχουν ελαφρά αυτών του δεξιού κόλου (L/R=13/10). Τα μεγέθη αυτά δεν εκφράζουν στατιστική σημαντικότητα ($p>0,05$). Επίσης, αν και οι K-ras μεταλλάξεις ήταν συχνότερες στο δεξιό σε σχέση με το αριστερό κόλον (mt/total=3/10 vs 1/13), αυτή η υπεροχή δεν ήταν επίσης στατιστικά σημαντική ($p=0,16$) (πίνακες 2,4,8). Στο ca-bearing group δεν υπάρχει διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο K-ras ανάμεσα στο δεξιό και το αριστερό κόλον (8 από τους 16 καρκίνους του δεξιού κόλου και 5 από τους 8 καρκίνους του αριστερού κόλου έφεραν τη μετάλλαξη, πίνακας 3, $p=0,67$). Τέλος, ο καρκίνος του δεξιού κόλου ως ποσοστό του συνόλου των καρκίνων είχε ίδιο ποσοστό στα δύο φύλα (Γυναίκες = $2/6 = 33,33\%$, Άνδρες = $6/18 = 33,33\%$, πίνακας 3), γεγονός που δεν συμφωνεί με τη βιβλιογραφία¹⁷² και οφείλεται πιθανότατα στο μικρό αριθμό ασθενών. Τα δεδομένα αυτά αναλύονται στους πίνακες 2-5 και 8.

4. Η μετάλλαξη στο K-ras ανιχνεύθηκε στο 15% περίπου των φυσιολογικών ορθοκολικών ιστών από παχύ έντερο και ορθό με καλοήγη πολύποδα ή πολύποδες, ανεξάρτητα εάν το κόλον έφερε ορθοκολικό καρκίνο · το ποσοστό αυτό δεν διέφερε μεταξύ όλων των υποκατηγοριών των φυσιολογικών ιστών στα δύο groups των συμμετεχόντων :

- **Cancer-free bowel.** Μία από τις 12 Ben-NF ιστικές περιοχές (8,33%), δύο από τις 8 Aden-NN ιστικές περιοχές (25%) και μία από τις 7 Serr-NN ιστικές περιοχές (14,28%) περιείχαν τουλάχιστον ένα αλληλίο με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του K-ras (πίνακες 4 και 7). Οι φυσιολογικές ιστικές περιοχές στην ομάδα αυτή έφεραν συνολικά τη μετάλλαξη σε ποσοστό 14,81% (4/27).
- **Cancer-bearing bowel.** 4 από τις 21 Ca-NN ιστικές περιοχές (19,05 %) ήταν μεταλλαγμένες στο K-ras, καμία από τις δύο Aden-NN ιστικές περιοχές δεν έφερε τη μετάλλαξη ενώ μία από τις 11 Ca-NF ιστικές περιοχές (9,1%) έφερε μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του K-ras. Το ποσοστό των μεταλλαγμένων φυσιολογικών ιστικών περιοχών επί του συνόλου των φυσιολογικών ιστικών περιοχών ανήλθε στο 14,70 % (5/34) (πίνακες 3 και 7), στατιστικά ταυτόσημο με την ομάδα χωρίς καρκίνο, $p=1$ (πίνακες 3,4 και 7).
- Στο **σύνολο των συμμετεχόντων** (εκτός της ομάδας ελέγχου), το 14,75 % (9/61) των φυσιολογικών ιστικών περιοχών του ήταν φορείς της μετάλλαξης K-ras (πίνακας 7).
- Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν κάποια εναλλακτική ταξινόμηση των φυσιολογικών ιστικών περιοχών θα μπορούσε ενδεχομένως να μας αποκαλύψει ομάδες ιστών που θα παρουσίαζαν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές ως προς την πιθανότητα να είναι K-ras μεταλλαγμένες, πραγματοποιήσαμε όλες τις δυνατές συγκρίσεις ανάμεσα στις κατηγορίες των ιστικών περιοχών (βάσει της αρχικής κατάταξης, σελίδα 76), ανάμεσα σε όλες τις υπερκατηγορίες των ιστικών περιοχών (σελίδα 77), ανάμεσα σε όλες τις υποκατηγορίες των ιστικών περιοχών (σελίδα 77) και αναμεταξύ τους. Η σύγκριση έγινε τόσο εντός της ίδιας ομάδας των συμμετεχόντων, όσο και μεταξύ των δύο ομάδων. Καμία σύγκριση δεν απέδωσε στατιστική σημαντικότητα : η μετάλλαξη K-ras ήταν το ίδιο πιθανό (15%) να ανιχνευτεί σε φυσιολογική ορθοκολική ιστική περιοχή από κόλον με πολυποειδικό ιστό, είτε το αυτό έφερε καρκίνο είτε όχι (σε όλες τις συγκρίσεις $p > 0,05$) .

Προέλευση φυσιολογικού ιστού	Ομάδες	mt K-ras	wt K-ras	Ποσοστά της K-ras μετάλλαξης
Ben-NF	Ca-free	1	11	1/12=8,33 %
Ca-NF	Ca-bearing	1	10	1/11=9,10 %
Aden-NN	Αμφότερες	2	8	2/10=20,00 %
Serr-NN	Αμφότερες	1	6	1/7=14,28 %
Ca-NN	Ca-bearing	4	17	4/21=19,05 %
Aden-NN	Ca-free	2	6	2/8=25,00%
Aden-NN	Ca-bearing	0	2	0/2=0,00%
Serr-NN	Ca-free	1	6	1/7=14,28%
LGD-NN	Αμφότερες	1	7	1/8=12,50%
LGD-NN	Ca-free	1	5	1/6=16,66%
LGD-NN	Ca-bearing	0	2	0/2=0,00%
HDG-NN	Ca-bearing	1	1	½=50,00%
Ben-NN (Aden-NN + Serr-NN)	Αμφότερες	3	14	3/17=17,64 %
Ben-NN (Aden-NN + Serr-NN)	Ca-free	3	12	3/15=20,00%
Normal Far tissues globally (BEN-NF + Ca-NF)	Αμφότερες	2	21	2/23=14,28%
Cancer-bearing : θετικότητα ανά ασθενή	Ca-bearing	5	17	5/22=22,72%
Cancer-free : θετικότητα ανά ασθενή	Ca-free	3	12	3/15=20,00 %
Συνολική θετικότητα ανά ασθενή	Αμφότερες	8	29	8/37=21,62%
Cancer-bearing bowel (σύνολο ιστικών περιοχών)	Ca-bearing	5	29	5/34=14,70 %
Cancer-free bowel (σύνολο ιστικών περιοχών)	Ca-free	4	23	4/27=14,81 %
Ολικός αριθμός ιστικών περιοχών	Αμφότερες	9	52	9/61=14,75 %

Πίνακας 7 : Φυσιολογικοί ορθοκολικοί ιστοί της έρευνας και K-ras μετάλλαξη. Τα ποσοστά των μεταλλάξεων του K-ras μεταξύ των διαφόρων ομάδων των φυσιολογικών ιστών στο cancer-free group, στο cancer-bearing group και συνολικά στις δύο αυτές ομάδες. Με κόκκινο χρώμα περιγράφονται οι πέντε φυσιολογικές ιστικές περιοχές, όπως αυτές κωδικοποιήθηκαν από την αρχή στη μελέτη μας. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνονται οι υποκατηγορίες των ιστικών περιοχών, ενώ με γαλάζιο χρώμα οι συνδυασμοί και οι υπερκατηγορίες αυτών. Συγκρίνοντας όλα τα πιθανά ζεύγη μεταξύ κάθε φυσιολογικής ιστικής περιοχής, μεταξύ των υποκατηγοριών αυτών, μεταξύ των υπερκατηγοριών αυτών, αλλά και αναμεταξύ όλων αυτών των ομάδων ιστικών περιοχών, διαπιστώνουμε ότι **τα ποσοστά των K-ras μεταλλάξεων δεν διαφέρουν ουσιαστικά στις φυσιολογικές ιστικές περιοχές** (σε όλες τις συγκρίσεις το p κυμαίνεται από 0,24 έως 1, δηλαδή >0,05) : η μετάλλαξη K-ras βρίσκεται στα ίδια ποσοστά (**περίπου 15%**) στους φυσιολογικούς ιστούς του κόλου (παχύ έντερο και ορθό), όταν αυτό περιέχει πολύποδες, ανεξάρτητα εάν συνυπάρχει καρκίνος στο κόλον αυτό και ανεξάρτητα εάν ο φυσιολογικός ιστός είναι κοντά ή μακριά από τον πολύποδα ή τον καρκίνο. Οι ακραίες τιμές των ποσοστών που παρατηρούνται σε 3 υποκατηγορίες (0 και 50%) οφείλονται πιθανότατα στον πολύ μικρό αριθμό των ιστικών περιοχών σε αυτές. Ο όρος «θετικότητα ανά ασθενή» προσδιορίζει την πιθανότητα το φυσιολογικό κόλον ενός μέλους μιας ομάδας (πχ του ca-bearing group) να φέρει μετάλλαξη στο K-ras και υπολογίστηκε στην υποομάδα των ατόμων της συγκεκριμένης ομάδας, στα οποία υπήρχε διαθέσιμη τουλάχιστον μία φυσιολογική ιστική περιοχή (αναλογία των ατόμων με μετάλλαξη στο K-ras προς το σύνολο των ατόμων με φυσιολογικές ιστικές περιοχές).

5. Η K-ras μετάλλαξη στα δύο groups (cancer-free, cancer-bearing) ήταν συχνότερη από την ομάδα ελέγχου, από την οποία απουσίαζε παντελώς. Όλες οι ιστικές περιοχές στην ομάδα ελέγχου (39) ήταν αρνητικές για τη μετάλλαξη τόσο στο κωδικόνιο 12 όσο και στο κωδικόνιο 13 (mt/total=0/39=0%). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι σε ένα παχύ έντερο/ορθό που δεν αναδεικνύεται ενδοσκοπικά φλεγμονή, πολύποδας, καρκίνος, εκκολπωμάτωση ή άλλη μακροσκοπική παθολογία (αντιπροσωπεύει δυνητικά το γενικό φυσιολογικό πληθυσμό), πιθανότατα απουσιάζει και η σωματική μετάλλαξη στο K-ras. Επειδή η μετάλλαξη αυτή είναι ένα είδος δοσίμετρου σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ένα καθ' ολοκληρίαν ελεγχθέν μακροσκοπικά φυσιολογικό παχύ έντερο/ορθό, αντιστοιχεί πιθανότατα σε μικροσκοπικά φυσιολογικά βλεννογόνο, στον οποίο δεν έχει επιδράσει κάποιος μεταλλαξιογόνος περιβαλλοντικός παράγοντας, ικανός να προκαλέσει σημειακή μετάλλαξη στο πρωτοογκογονίδιο K-ras. Οι φυσιολογικές ιστικές περιοχές στο ca-bearing group είχαν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0,018$). Ομοίως, και οι φυσιολογικές περιοχές του ca-free group είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να φέρουν τη μετάλλαξη σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές ($p=0,024$). Αθροιστικά, επίσης, οι δύο ομάδες, λογιζόμενες ως ενιαίο σύνολο, είχαν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις στους φυσιολογικούς τους ιστούς συγκρινόμενες με την ομάδα ελέγχου (mt=9/61=14,75%, $p=0,01$).

6. Η μετάλλαξη στο K-ras εμφανίζεται πρώιμα στην πορεία της ογκογένεσης στο παχύ έντερο, εφόσον οι φυσιολογικοί ιστοί που βρίσκονται σε απόσταση από τα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα είχαν την ίδια πιθανότητα να φέρουν τη μετάλλαξη με την ομάδα ελέγχου, αλλά οι φυσιολογικοί ιστοί πλησίον των νεοπλασμάτων αυτών είχαν περισσότερες μεταλλάξεις K-ras σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όλοι οι απομακρυσμένοι από νεοπλάσματα φυσιολογικοί ιστοί είχαν την ίδια συχνότητα μετάλλαξης με την ομάδα ελέγχου (συγκρίνοντας με την ομάδα ελέγχου : BEN-NF, $p=0,23$, σύγκριση με τις Ca-NF, $p=0,22$ και σύγκριση με το σύνολο των απομακρυσμένων φυσιολογικών ιστών, $p=0,23$). Όταν όμως η δειγματοληψία αφορούσε σε φυσιολογικούς ιστούς πλησίον των νεοπλασμάτων, η διαφορά στη συχνότητα παρουσίας της μετάλλαξης αποκτούσε στατιστική σημαντικότητα. Έτσι, οι φυσιολογικές ιστικές περιοχές Ca-NN ($p=0,01$), Ben-NN αθροιστικά στα δύο groups ($p=0,024$), Ben-NN στο ca-free group ($p=0,018$), οι Aden-NN αθροιστικά στα δύο groups ($p=0,038$) και οι Aden-NN στο ca-free group ($p=0,025$) είχαν περισσότερες μεταλλάξεις στο K-ras σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ισχυρή ένδειξη πρωιμότητας της K-ras μετάλλαξης στην ανάπτυξη της ορθοκολικής καρκινογένεσης.

7. Το όλον κόλον (παχύ έντερο/ορθό) των ατόμων του cancer-bearing group ήταν οριακά πιο πιθανό να φέρει τη μετάλλαξη K-ras σε σχέση με το όλον κόλον (παχύ έντερο/ορθό) των ατόμων του cancer-free group, ενώ και οι δύο ομάδες ασθενών ήταν πολύ πιο πιθανό να φέρουν τη μετάλλαξη σε σχέση με το control group. Τα ποσοστά παρουσίας της μετάλλαξης στο σύνολο των ιστικών περιοχών του ca-bearing bowel ήταν 24/78=30,77%, ποσοστό σαφώς μεγαλύτερο από το αντίστοιχο 16 % (8/50) του cancer-free bowel. Η διαφορά αυτή έδειξε μία τάση (trend), αλλά οριακά δεν διήλθε το κατώφλι σημαντικότητας ($p=0,059$). Η τάση αυτή εξηγείται μεν από τη συσσώρευση περισσότερων K-ras μεταλλάξεων στην πορεία προς τον καρκίνο, αφού η μετάλλαξη αυτή μπορεί να προκύψει σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας της ορθοκολικής καρκινογένεσης, παραμένει όμως υποδεέστερη της προσδοκώμενης¹¹⁸. Στο σύνολό τους, τόσο το ca-bearing group όσο και το ca-free group είχαν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από την ομάδα ελέγχου ($p<0,001$ και $p=0,008$ αντίστοιχα).

8. Η πιθανότητα να υπάρχει η μετάλλαξη K-ras στο φυσιολογικό τμήμα του κόλου ενός ατόμου (ασθενούς ή μη) που φέρει ορθοκολικούς πολύποδες δεν εξαρτάται από την παρουσία ή όχι καρκίνου στο κόλον αυτό και είναι περίπου 20%. Εξετάζοντας τα ποσοστά θετικότητας ανά ασθενή, πέντε από τους 22 (22,72%) ασθενείς του ca-bearing group, που είχαν διαθέσιμη τουλάχιστον μία φυσιολογική ιστική περιοχή, είχαν μετάλλαξη K-ras στην περιοχή αυτή (πίνακες 3 και 7), και σε τρία από τα 15 μέλη του ca-free group (20%), που υπήρχε διαθέσιμη τουλάχιστον μία φυσιολογική ιστική περιοχή, ανιχνεύθηκε σε αυτήν μετάλλαξη του K-ras (πίνακες 4 και 7), ποσοστά χωρίς στατιστική διαφορά μεταξύ τους ($p=1$). Η σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (εθελοντές με θετικότητα στη μετάλλαξη K-ras = 0/13 = 0%) δεν έδωσε στατιστική σημαντικότητα ούτε για το ca-bearing group ($p=0,13$), ούτε για το ca-free group ($p=0,22$). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε φαινομενική αντίφαση με το συμπέρασμα της παραγράφου 5, ότι δηλαδή οι φυσιολογικές ιστικές περιοχές αμφοτέρων των ομάδων με πολύποδες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να φέρουν τη μετάλλαξη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτή η αντίφαση πιθανότατα οφείλεται στο μικρό αριθμό των μελών των τριών ομάδων της παρούσας μελέτης και στο μικρό αριθμό (περίπου 3) ιστικών περιοχών ανά συμμετέχον μέλος (πίνακας 1).

9. Η μετάλλαξη K-ras δεν συμβάλλει στη μετατροπή του μη προχωρημένου αδενώματος σε προχωρημένο : ανιχνεύθηκε στα μισά από τα προχωρημένα παραδοσιακά αδενώματα και σε κανένα από τα μη προχωρημένα παραδοσιακά αδενώματα. Στους ασθενείς και των δύο ομάδων αθροιστικά, το 22,72% (5/22) των αδενωμάτων έφερε τη μετάλλαξη. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών θετικότητας στις δύο ομάδες : 2 στις 8 (25%) Aden-t στο ca-bearing group και 3 στις 14 (21,42%) Aden-t στο ca-free group έφεραν τη μετάλλαξη, $p=1$ (πίνακες 3,4,8 και 9). Καμία από τις Aden-t που ανήκαν σε μη προχωρημένα αδενώματα δεν ήταν φορέας της K-ras μετάλλαξης, ανεξάρτητα εάν αυτή ανήκε στο cancer-free bowel ή στο cancer-bearing bowel (mt/total = 0/8 και 0/4 αντίστοιχα, 0/12 συνολικά, 0%). Αντιθέτως, οι μισές Aden-t που ανήκαν σε προχωρημένα αδενώματα έφεραν τη μετάλλαξη. Το ποσοστό αυτό ήταν το ίδιο ανεξαρτήτως εάν ταυτόχρονα συνυπήρχε καρκίνος στο ίδιο έντερο (mt/total = 2/4 στο cancer-bearing bowel και 3/6 στο cancer-free bowel). Η συχνότερη ανίχνευση της K-ras μετάλλαξης στα προχωρημένα σε σχέση με τα μη προχωρημένα αδενώματα είναι στατιστικά σημαντική (Fischer exact test, $p=0,009$). Συνεπώς, τα προχωρημένα αδενώματα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης K-ras μετάλλαξης σε σχέση με τα μη προχωρημένα. Εξετάζοντας μεμονωμένα κάθε κριτήριο των προχωρημένων αδενωμάτων, προέκυψε ότι κανένα εξ αυτών δεν επηρεάζει την πιθανότητα ανίχνευσης της K-ras μετάλλαξης : η συχνότητα της μετάλλαξης δεν διέφερε ούτε μεταξύ αυτών με διάμετρο μικρότερης έναντι αυτών με μεγαλύτερη του 1 εκ ($p=0,11$), ούτε μεταξύ αυτών που περιείχαν μόνο χαμηλόβαθμη δυσπλασία σε σύγκριση με αυτά που είχαν έστω και μία εστία υψηλόβαθμης δυσπλασίας ($p=0,54$), ούτε η παρουσία του λαχνωτού στοιχείου σε ποσοστό άνω του 80% ήταν παράγοντας που επηρέαζε το K-ras status (τα λαχνωτά αδενώματα περιείχαν μεταλλάξεις στο K-ras σε ποσοστό 30,77 %, mt/total 4/13, ενώ τα σωληνώδη ή τα σωληνολαχνωτά είχαν μεταλλάξεις στο 11,11%, mt/total = 1/9, $p=0,36$) (πίνακας 8). Η εντόπιση του αδενώματος στο δεξιό ή το αριστερό κόλον δεν ήταν, ομοίως, παράγοντας που επηρέαζε το ποσοστό της μετάλλαξης, ως προαναφέρθηκε (παράγραφος 3).

A/A	ΚΩΔ	Φύλο	HGD?	μέγεθος (εκ)	λαχνωτό στοιχείο > 80 %?	κατηγορία	εντόπιση στο κόλον	L/R	Cancer- bearing bowel?	K-ras status
1	1	A	OXI	0,8	NAI	Non-adv	Κατión	L	NAI	wt
2	57	Γ	OXI	0,8	NAI	Non-adv	Ανión	R	NAI	wt
3	58	A	OXI	0,8	NAI	Non-adv	Ανión	R	NAI	wt
4	4	A	OXI	0,8	NAI	Non-adv	Εγκάρσιο	R	NAI	wt
5	49	A	OXI	1,5	OXI	Advanced	Ορθό	L	NAI	mt12
6	81	A	OXI	1,2	NAI	Advanced	Σιγμοειδές	L	NAI	wt
7	4	A	NAI	1,5	NAI	Advanced	Ανión	R	NAI	wt
8	19	A	OXI	1,2	NAI	Advanced	Σιγμοειδές	L	NAI	mt12
9	111	Γ	OXI	0,6	OXI	Non-adv	Ανión	R	OXI	wt
10	13	Γ	OXI	0,4	OXI	Non-adv	Εγκάρσιο	R	OXI	wt
11	3	A	OXI	0,4	OXI	Non-adv	Ανión	R	OXI	wt
12	31	Γ	OXI	0,4	OXI	Non-adv	Κατión	L	OXI	wt
13	48	A	OXI	0,6	OXI	Non-adv	Ορθό	L	OXI	wt
14	11	A	OXI	0,8	OXI	Non-adv	Εγκάρσιο	R	OXI	wt
15	25	Γ	OXI	0,6	OXI	Non-adv	Τυφλό	R	OXI	wt
16	9	A	OXI	0,6	OXI	Non-adv	Εγκάρσιο	R	OXI	wt
17	75	A	NAI	0,8	NAI	Advanced	Ανión	R	OXI	mt12
18	111	Γ	NAI	1,2	NAI	Advanced	Σιγμοειδές	L	OXI	wt
19	13	Γ	NAI	1,6	NAI	Advanced	Ορθό	L	OXI	wt
20	3	A	NAI	1,1	NAI	Advanced	Εγκάρσιο	R	OXI	mt12
21	18	Γ	OXI	2,0	NAI	Advanced	Ανión	R	OXI	mt12
22	23	A	OXI	1,1	NAI	Advanced	Σιγμοειδές	L	OXI	wt

Πίνακας 8 : Κατηγοριοποίηση των κλασικών (παραδοσιακών) αδενωμάτων της έρευνας,
βάσει των ενδοσκοπικών, ιστολογικών και μοριακών (ως προς τη μετάλλαξη K-ras)
χαρακτηριστικά αυτών.

Non-adv: μη προχωρημένα αδενώματα

Advanced: προχωρημένα αδενώματα

HGD : Υψηλόβαθμη δυσπλασία

R: εντόπιση του αδενώματος στο δεξιό κόλον

L: εντόπιση του αδενώματος στο αριστερό κόλον

Καφέ χρωματισμός : αδενώματα από το cancer-bearing bowel

Γαλάζιος χρωματισμός : αδενώματα από το cancer-free bowel

10. Τα παραδοσιακά και τα οδοντωτά αδενώματα δεν διαφέρουν στατιστικά ως προς τη συχνότητα ανίχνευσης της K-ras μετάλλαξης. 14 ιστικές περιοχές από οδοντωτά νεοπλάσματα εξετάστηκαν, πέντε από το cancer-bearing bowel και εννέα από το cancer-free bowel. Καμία από τις οδοντωτές αλλοιώσεις δεν έφερε υψηλόβαθμη δυσπλασία ούτε είχε μέγεθος μεγαλύτερο του 1 εκ. Χαρακτηρίστηκαν, επομένως, μη προχωρημένα νεοπλάσματα. Όσες εξ αυτών είχαν K-ras μετάλλαξη, αυτή αφορούσε στο κωδικόνιο 12 : μία από τις πέντε (ca-bearing group) και μία από εννέα (ca-free group) οδοντωτές ιστικές περιοχές έφεραν τη μετάλλαξη. Τα ποσοστά δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (20% και 11,11% αντίστοιχα, $p=1$) - πίνακες 3,4 και 9. Αθροιστικά, στις δύο ομάδες, το 14,28% (2/14) των οδοντωτών αλλοιώσεων ήταν φορείς της μετάλλαξης. Η συχνότητα των K-ras μεταλλάξεων στις οδοντωτές αλλοιώσεις (14,28%) δεν διέφερε στατιστικά, όταν τη συγκρίναμε με το σύνολο των αδενωμάτων (22,72%, $p=0,68$). Επίσης δεν υπήρχε στατιστική διαφορά μεταξύ των αδενωμάτων και των οδοντωτών αλλοιώσεων εντός της ίδιας ομάδας ασθενών (πίνακας 9) : στο ca-free group τα ποσοστά ήταν 21,42% για τα κλασικά αδενώματα και 11,11% για τα οδοντωτά αδενώματα ($p=0,63$), ενώ στο ca-bearing group τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 25% και 20% ($p=1$). Κατευθύνοντας τη σύγκριση των οδοντωτών αλλοιώσεων με τα μη προχωρημένα κλασικά αδενώματα δεν κατεγράφη ουσιαστική διαφορά (2/14 έναντι 0/12, $p=0,18$ - πίνακας 9), άρα τα μη προχωρημένα αδενώματα με τις οδοντωτές αλλοιώσεις έχουν τα ίδια ποσοστά μεταλλάξεων K-ras. Συγκρίνοντας όμως τα οδοντωτά αδενώματα με τα προχωρημένα κλασικά αδενώματα, παρατηρήθηκε μία τάση προς τη σημαντικότητα (trend): φαίνεται ότι τα προχωρημένα αδενώματα εμφανίζουν συχνότερα K-ras μεταλλάξεις σε σχέση με τις οδοντωτές αλλοιώσεις (5/10 έναντι 2/14 αντίστοιχα, $p=0,08$) (πίνακας 9). Η εντόπιση του οδοντωτού νεοπλάσματος στο δεξιό ή το αριστερό κόλον δεν επηρέαζε, ως προαναφέρθη, την πιθανότητα ανεύρεσης της μετάλλαξης (παράγραφος 3).

11. Η K-ras μετάλλαξη ανιχνεύθηκε περίπου στο 20% των καλοήθων πολυπόδων, είτε συνυπήρχε είτε όχι καρκίνος στο ίδιο έντερο. Συναθροίζοντας τα αδενώματα και τις οδοντωτές αλλοιώσεις σε ευρύτερη ομάδα (καλοήθεις πολύποδες), το 23,07 % (3/13) των καλοήθων πολυπόδων στο cancer-bearing bowel και το 17,4% (4/23) αυτών στο cancer-free bowel εμπεριείχαν τη μετάλλαξη. Αυτά τα ποσοστά δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($p=0,68$, πίνακας 9). Αθροιστικά, το 19,44 % του συνόλου των καλοήθων πολυπόδων ήταν K-ras μεταλλαγμένοι (7/36). Τα ποσοστά αυτά συμφωνούν με τα ποσοστά της βιβλιογραφίας^{52, 121, 173-179}. Δεν υπήρχε τέλος διαφορά στην πιθανότητα παρουσίας της μετάλλαξης μεταξύ των καλοήθων πολυπόδων του δεξιού και αυτών του αριστερού κόλου, όπως δείχθηκε στην παράγραφο 3.

12. Οι καλοήθεις πολύποδες του παχέος εντέρου/ορθού είχαν την ίδια πιθανότητα με τους φυσιολογικούς ιστούς του ιδίου κόλου να φέρουν μετάλλαξη στο K-ras, ανεξάρτητα από τη παρουσία ή όχι καρκίνου στο κόλον αυτό. Τα αδενώματα στο σύνολό τους είχαν ίσες K-ras μεταλλάξεις με τους φυσιολογικούς ιστούς πλησίον αυτών ($p=1$) και με το σύνολο των φυσιολογικών ιστών ($p=0,5$). Σημαντική διαφορά όμως καταγράφηκε μεταξύ μη προχωρημένων αδενωμάτων (είχαν την ίδια πιθανότητα να φέρουν τη μετάλλαξη K-ras με τους φυσιολογικούς ιστούς, $p=0,33$) και προχωρημένων (είχαν περισσότερες μεταλλάξεις από τους φυσιολογικούς ιστούς, $p=0,02$). Ομοίως με τα αδενώματα, οι οδοντωτές αλλοιώσεις είχαν επίσης την ίδια πιθανότητα να φέρουν την K-ras μετάλλαξη σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς πλησίον αυτών (% K-ras mt σε Serr-t=14,28%, % K-ras mt σε Serr-Nn=14,28%, $p=1$) και με το σύνολο των φυσιολογικών ιστών ($p=1$). Τα δεδομένα αυτά αναλύονται στους πίνακες 8 και 9. Το ποσοστό ανίχνευσης της μετάλλαξης στους καλοήθεις πολύποδες (παράγραφος 12) είναι περίπου ίδιο με την πιθανότητα που έχει ένα άτομο με ορθοκολικούς πολύποδες να φέρει μετάλλαξη στο φυσιολογικό τμήμα του κόλου του (παράγραφος 9), δηλαδή περίπου 20% ανεξάρτητα από την παρουσία σύγχρονου καρκίνου στο κόλον. Πράγματι, οι καλοήθεις πολύποδες αθροιστικά είχαν την ίδια πιθανότητα να φέρουν την K-ras μετάλλαξη (mt/total=7/36) σε σχέση τόσο με το σύνολο των φυσιολογικών ιστών (mt/total=9/61, $p=0,58$) όσο και με τους φυσιολογικούς ιστούς πλησίον αυτών (mt/total=3/17, $p=1$). Επίσης, εντός του ca-bearing group, οι καλοήθεις πολύποδες είχαν την ίδια συχνότητα K-ras μετάλλαξης (mt/total=3/13) με το σύνολο των φυσιολογικών ιστών (mt/total=5/34, $p=0,66$). Τέλος ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση ότι εντός του ca-free group, οι πολύποδες είχαν την ίδια πιθανότητα να έχουν αποκτήσει τη μετάλλαξη (mt/total=4/23), τόσο σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς πλησίον αυτών (mt/total=3/15, $p=1$), όσο και με το σύνολο των φυσιολογικών ιστών (mt/total=4/27, $p=1$) (πίνακες 9 και 11).

Προέλευση καλοήθους νεοπλασματικού ιστού	mt K-ras	wt K-ras	Ποσοστά της K-ras μετάλλαξης
Προχωρημένα αδενώματα / Ca-bearing bowel	2	2	2/4=50,00%
Προχωρημένα αδενώματα / Ca-free bowel	3	3	3/6=50,00%
Προχωρημένα αδενώματα συνολικά	5	5	5/10=50,00%
Μη προχωρημένα αδενώματα / Ca-bearing bowel	0	4	0/4=0,00%
Μη προχωρημένα αδενώματα / Ca-free bowel	0	8	0/8=0,00%
Μη προχωρημένα αδενώματα συνολικά	0	12	0/12=0,00%
Αδενώματα / Ca-bearing bowel	2	6	2/8=25,00%
Αδενώματα / Ca-free bowel	3	11	3/14=21,42%
Αδενώματα συνολικά	5	17	5/22=22,72%
Οδοντωτά νεοπλάσματα / Ca-bearing bowel	1	4	1/5=20,00%
Οδοντωτά νεοπλάσματα / Ca-free bowel	1	8	1/9=11,11%
Οδοντωτά νεοπλάσματα συνολικά	2	12	2/14=14,28%
Καλοήθεις πολύποδες / Ca-bearing bowel	3	10	3/13=23,07%
Καλοήθεις πολύποδες / Ca-free bowel	4	19	4/23=17,40%
Καλοήθεις πολύποδες συνολικά	7	29	7/36=19,44%

Πίνακας 9 : Καλοήθεις πολύποδες : τα ποσοστά των μεταλλάξεων του K-ras δεν διαφέρουν ουσιαστικά μεταξύ των διαφόρων υποκατηγοριών των καλοήθων πολυπόδων.

13. Η μετάλλαξη K-ras ανιχνεύθηκε στα μισά από τα πρωτοπαθή καρκινώματα του παχέος εντέρου/ορθού, ποσοστό που δεν επηρεαζόταν από το στάδιο του καρκίνου. Δείγματα από τους 24 καρκίνους της μελέτης εξετάστηκαν ιστοπαθολογικά και για μεταλλάξεις στο K-ras. Στο σύνολό τους επρόκειτο για μη οδοντωτά καρκινώματα. Κανένα από αυτά δεν είχε ιστολογικό δείγμα αδενώματος, που να συνυπήρχε με τον καρκίνο στην ίδια βλάβη. Έντεκα από αυτούς τους καρκίνους είχαν μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 και δύο στο κωδικόνιο 13. Όλοι οι καρκίνοι ήταν ομοιογενείς όσον αφορά το status του K-ras, με εξαίρεση μία περίπτωση (κωδικός 36), στην οποία το ένα καρκινικό δείγμα ήταν χωρίς μετάλλαξη (wild type) και το άλλο έφερε τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 (πίνακας 3). Αυτή η περίπτωση κατηγοριοποιήθηκε ως φέρουσα τη μετάλλαξη (mt 13). Συνολικά, το ποσοστό της παρουσίας της μετάλλαξης K-ras ήταν 54,16% (13/24, πίνακας 3). Τα ποσοστά θετικότητας δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε καρκινικά δείγματα προερχόμενα από ασθενείς με διαφορετικό στάδιο κατά Dukes (πίνακας 12) : 2 από τους 4 ασθενείς (50%) με στάδιο B , 7 από 12 ασθενείς (58,33%) με στάδιο C και 4 από τους 8 patients (50%) με στάδιο D έφεραν μετάλλαξη K-ras στον καρκίνο. Ούτε ένας ασθενής δεν σταδιοποιήθηκε στο στάδιο A κατά Dukes. Τα ποσοστά αυτά συμφωνούν εν γένει με τα ποσοστά της βιβλιογραφίας · η μικρή απόκλιση από τους μέρους όρους της βιβλιογραφίας^{118,179} μπορεί να εξηγηθεί από τον μικρό αριθμό των περιστατικών (24) και από την μεγαλύτερη μέση ηλικία που έχει η ομάδα μελέτης μας σε σχέση με την αντίστοιχη της βιβλιογραφίας.

A/A	Κωδικός	Στάδιο κατά Dukes	K-ras status
1	49	B	wt
2	57	B	mt12
3	51	B	wt
4	83	B	mt 12
5	81	C	mt 12
6	17	C	mt 12
7	58	C	mt 12
8	4	C	mt 12
9	19	C	wt
10	36	C	mt13
11	1	C	wt
12	20	C	mt 12
13	24	C	wt
14	85	C	mt 12
15	103	C	wt
16	76	C	wt
17	7	D	mt12
18	66	D	wt
19	71	D	wt
20	88	D	mt13
21	102	D	wt
22	108	D	wt
23	90	D	mt12
24	14	D	mt12

Πίνακας 10 : Η σχέση της μετάλλαξης στο K-ras με τη σταδιοποίηση των ορθοκολικών καρκίνων στο cancer-bearing group : το ποσοστό θετικότητας της μετάλλαξης **δεν εξαρτάται** από το στάδιο του καρκίνου.

14. Το K-ras status συμφωνεί αξιοσημείωτα μεταξύ των νεοπλασματικών και των μη νεοπλασματικών ορθοκολικών ιστών· η συμφωνία όμως αυτή έχει πρακτική σημασία μόνο στην ομάδα του cancer-free group.

- ο Στους ασθενείς του **cancer-bearing** group βρέθηκε πολύ σημαντική συμφωνία (68,18%), όσον αφορά το K-ras status, ανάμεσα στους καρκινικούς και στους φυσιολογικούς ιστούς : πέντε από τους 12 καρκίνους που ήταν K-ras μεταλλαγμένοι είχαν την ίδια ακριβώς μετάλλαξη στο K-ras με το σύστοιχό τους φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο και 10 στους 10 (100%) από τους καρκινικούς ιστούς χωρίς τη μετάλλαξη (wt K-ras) είχαν ομοίως wild-type K-ras συνυπάρχοντα φυσιολογικό βλεννογόνο. Λεπτομερέστερα, η συμφωνία με τον παρακείμενο στον καρκίνο βλεννογόνο ήταν 50% (12/24), ενώ με τον απομακρυσμένο φυσιολογικό βλεννογόνο ήταν στο 45,45% (5/11). Παρά την αξιόλογη συμφωνία και τη φαινομενική ομοιότητα μεταξύ των προαναφερθέντων ιστών, υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους. Αυτές οι διαφορές αξιολογούνται, διότι έχουν στατιστική σημαντικότητα ($p=0,039$). Εάν η σύγκριση επιμερισθεί, οι διαφορές επιδεικνύουν επίσης στατιστική σημαντικότητα συγκρίνοντας τη συχνότητα της K-ras μετάλλαξης στον καρκινικό ιστό τόσο σε σχέση με τους Ca-Nn ιστούς ($p=0,029$) όσο και σε σύγκριση με τους Ca-Nf ιστούς ($p=0,023$). Μπορεί, ως εκ τούτου, να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι **δεν υπάρχει αντιστοιχία** μεταξύ ορθοκολικού καρκινικού και συνυπάρχοντος φυσιολογικού ιστού. Συνεπώς **το K-ras status του καρκίνου στο παχύ έντερο και το ορθό δεν μπορεί να προβλεφθεί κατ' εκτίμηση από τον φυσιολογικό ιστό του ίδιου εντέρου.**
- ο Αντιθέτως, στα μέλη του **cancer-free** group, η συμφωνία ανάμεσα σε νεοπλασματικούς και μη ιστούς ήταν ακόμη μεγαλύτερη (82,60 %). Από τις 4 φυσιολογικές ιστικές ορθοκολικές περιοχές (απομακρυσμένες ή παρακείμενες) που συνυπήρχαν με πολύποδες, μεταλλαγμένους ως προς το K-ras, οι δύο έφεραν την ίδια ακριβώς μετάλλαξη K-ras με τον πολύποδα και 17 από τις 19 φυσιολογικές ιστικές περιοχές που συνυπήρχαν με wild type K-ras καλοήθεις ορθοκολικούς πολύποδες ήταν επίσης wild type K-ras. Αυτές οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p=0,12$). Συνεπώς στην ομάδα αυτή **υπάρχει αντιστοιχία** μεταξύ του πολυποειδικού και του φυσιολογικού ιστού, και, ως εκ τούτου, **το K-ras status του καλοήθους ορθοκολικού πολύποδα μπορεί να εκτιμηθεί με σχετική ασφάλεια από το K-ras status του φυσιολογικού ιστού από το ίδιο έντερο.**

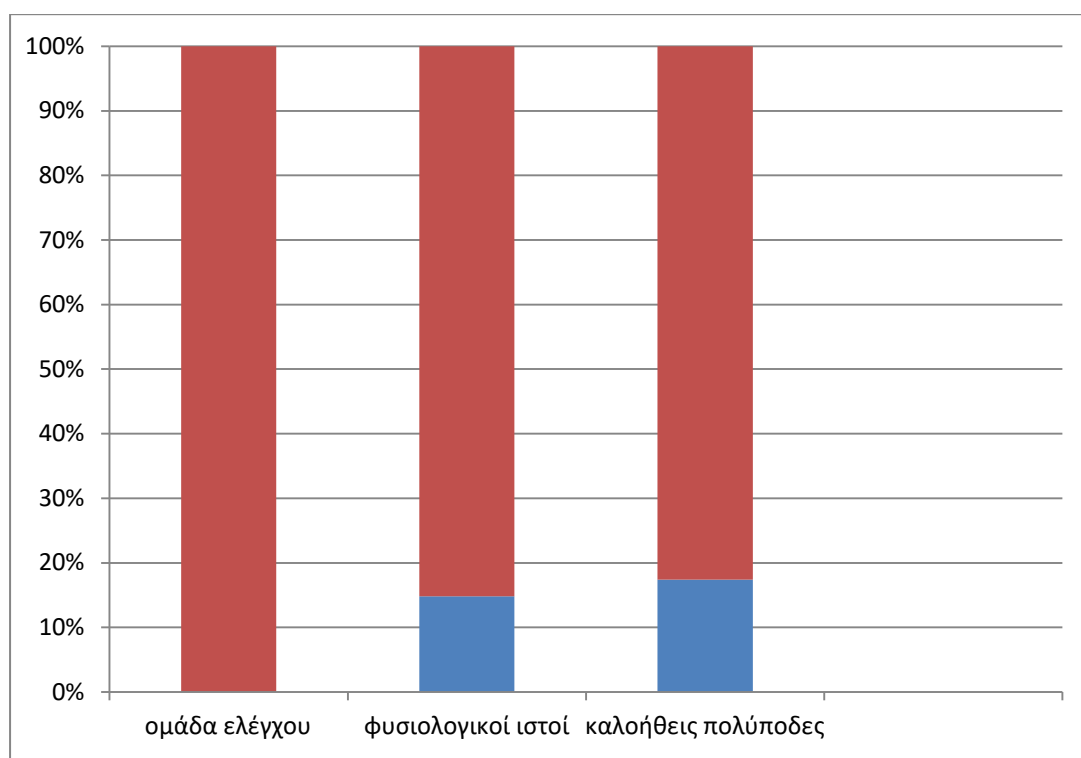
15. Το K-ras status στον ορθοκολικό καρκινικό ιστό διέφερε σημαντικά σε σχέση με τις περισσότερες κατηγορίες καλοήθων πολυπόδων. Ο καρκινικός ιστός ήταν πιο πιθανό να έχει την K-ras μετάλλαξη σε σχέση με το άθροισμα των καλοήθων νεοπλασμάτων στις 2 ομάδες των ασθενών, όταν αυτές συγχωνευθούν σε μία, καθώς υπερείχε έναντι των καλοήθων πολυπόδων συνολικά ($p=0,01$), έναντι των αδενωμάτων συνολικά ($p=0,038$), έναντι του συνόλου των μη προχωρημένων αδενωμάτων ($p=0,02$) και έναντι όλων των οδοντωτών αλλοιώσεων ($p=0,019$). Αντιθέτως, καρκίνος και προχωρημένα αδενώματα είχαν ίδια πιθανότητα K-ras μεταλλάξεων (13/24 vs 5/10 αντίστοιχα έφεραν τη μετάλλαξη, $p=0,82$) (πίνακες 3, 4 και 9). Επίσης διαπιστώσαμε ότι υπάρχει σχετική συμφωνία του καρκινικού ιστού με τους συνυπάρχοντες καλοήθεις πολύποδες και εντός του ca-bearing group. Αυτή ανέρχεται στο 33,33 %, είτε αναφερόμαστε στα αδενώματα (2/6), είτε στις οδοντωτές αλλοιώσεις (1/3) είτε στα καλοήθη νεοπλάσματα εν συνόλω (3/9). Ακόμη βρέθηκε ότι στο group αυτό, οι καλοήθεις και οι κακοήθεις νεοπλασματικοί ιστοί είχαν ίδια συχνότητα K-ras μεταλλάξεων : οι καρκινικοί ιστοί είχαν την ίδια πιθανότητα μετάλλαξης με τους καλοήθεις πολύποδες ($p=0,09$), με τα αδενώματα ($p=0,22$), με τα μη προχωρημένα και τα προχωρημένα αδενώματα ($p=0,1$ και 1 αντίστοιχα) και με τις οδοντωτές αλλοιώσεις ($p=0,32$).

16. Η μετάλλαξη στο K-ras ανιχνεύθηκε στις λιγότερες από τις μισές δευτεροπαθείς ηπατικές μεταστατικές εστίες από ορθοκολικό καρκίνο. Η μετάλλαξη στο K-ras ήταν παρούσα στο 42,85 % (3/7) των ηπατικών εστιών που μικροσκοπήθηκαν (πίνακας 3). Αυτή η συχνότητα δεν διέφερε στατιστικά από αυτή της πρωτοπαθούς εστίας ($p=0,65$).

17. Η μετάλλαξη K-ras δεν συμβάλλει στη μεταστατική εξαλλαγή του καρκινώματος : οι μεταστατικές ηπατικές εστίες συμφωνούν, ως προς το K-ras status, τόσο με την πρωτοπαθή καρκινική εστία όσο και με τους φυσιολογικούς ιστούς κοντά σε αυτή. Υπήρχε απόλυτη συμφωνία ως προς το K-ras status μεταξύ της δευτεροπαθούς ηπατικής εστίας και της πρωτοπαθούς ορθοκολικής καρκινικής εστίας (και τα 7 ζεύγη είχαν ίδιο K-ras status – ταύτιση 100%). Τέλος, διαπιστώθηκε σημαντικό ποσοστό συμφωνίας (71,42%) μεταξύ της δευτεροπαθούς ηπατικής εστίας και του φυσιολογικού ορθοκολικού ιστού κοντά στην αντίστοιχη πρωτοπαθή καρκινική εστία (5 από τα 7 ζεύγη είχαν ίδιο K-ras status). Αυτές οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p=0,65$ για τη σύγκριση με την πρωτοπαθή εστία, $p=0,58$ για τη σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό πλησίον της πρωτοπαθούς εστίας). Τα ζεύγη με τα αντίστοιχα K-ras status περιγράφονται στον πίνακα 3. Λόγω του μικρού αριθμού των μεταστατικών ηπατικών εστιών, η ομοιότητα χρήζει επιβεβαίωσης σε μεγαλύτερο αριθμό περιπτώσεων.

18. Τα προχωρημένα αδενώματα συμπεριφέρονται, ως προς την K-ras μετάλλαξη, παρόμοια με τον καρκίνο. Το ποσοστό θετικότητας της K-ras μετάλλαξης είναι στα προχωρημένα αδενώματα 50% και στον καρκινικό ιστό 54,16% ($p=1$). Αμφότερες οι ομάδες ιστών είναι περισσότερο πιθανό να φέρουν τη μετάλλαξη σε σχέση με τα μη προχωρημένα αδενώματα ($p=0,009$ και 0,02 αντίστοιχα), σε σχέση με τις οδοντωτές αλλοιώσεις ($p=0,08$ και 0,019 αντίστοιχα) και σε σχέση με το σύνολο των φυσιολογικών ιστών ($p=0,02$ και $<0,001$ αντίστοιχα). Επίσης, τόσο τα προχωρημένα αδενώματα όσο και ο καρκινικός ιστός είχαν παρόμοια ποσοστά μεταλλάξεων K-ras σε σύγκριση με τα ποσοστά της K-ras μετάλλαξης στις μεταστατικές εστίες ($p=0,65$ για αμφότερες τις συγκρίσεις).

19. Στο cancer-free group η μετάλλαξη K-ras συμβάλλει στην έναρξη της ογκογένεσης, αλλά δεν συμβάλλει στην ανάπτυξη του φαινοτύπου του καλοήθους πολύποδα : παρατηρείται αύξηση της συχνότητας της K-ras μετάλλαξης από τον φυσιολογικό, μη μεταλλαγμένο (wt K-ras), ορθοκολικό ιστό στον φυσιολογικό μεταλλαγμένο (mt K-ras) ιστό, αλλά όχι από τον φυσιολογικό μεταλλαγμένο (mt K-ras) ιστό στους καλοήθεις πολύποδες. Οι φυσιολογικοί ιστοί στο group αυτό έχουν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από τον γενικό πληθυσμό (14,81% vs 0%, $p=0,024$) αλλά ίσες K-ras μεταλλάξεις σε σχέση με τους καλοήθεις πολύποδες (14,81% vs 17,39 %, $p=1$). Έτσι φαίνεται ότι το κομβικό σημείο στην ογκογένεση είναι η απόκτηση της K-ras μετάλλαξης στον φυσιολογικό ορθοκολικό ιστό (πιο συγκεκριμένα : στον ιστό που βρίσκεται κοντά στο σημείο που θα αναπτυχθεί ο μελλοντικός πολύποδας, παράγραφος 6), στον οποίο και ξεκινά τη διαδικασία της καρκινογένεσης (initiation), ενώ η K-ras μετάλλαξη δεν συμβάλλει στη μετατροπή του φυσιολογικού μεταλλαγμένου (mt K-ras) ιστού σε καλοήγη πολύποδα (promotion).



Γράφημα 1. Ca-free group: η συχνότητα της K-ras μετάλλαξης στις φυσιολογικές και νεοπλασματικές περιοχές του group σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η συχνότητα της K-ras μετάλλαξης είναι ίδια ανάμεσα στις φυσιολογικές και τις νεοπλασματικές περιοχές του group και είναι μεγαλύτερη στο ca-free group –θεωρούμενης ως ενιαίας οντότητας - σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το K-ras status του φυσιολογικού ιστού από το παχύ έντερο/ορθό στο group αυτό μπορεί να προβλέψει το K-ras status του καλοήθους νεοπλασματικού ιστού από το ίδιο παχύ έντερο/ορθό.

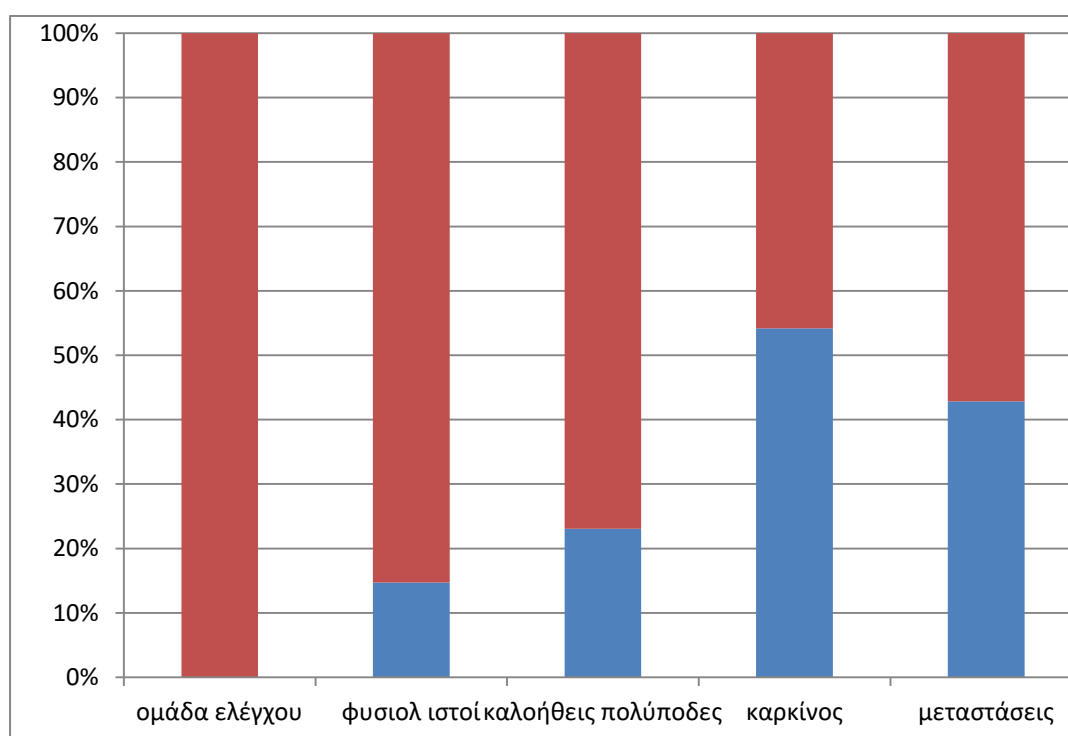
Γαλάζιο χρώμα : ιστοί με μετάλλαξη στο K-ras (mt K-ras)
Κόκκινο χρώμα : ιστοί με φυσιολογικό K-ras (wt K-ras).

20. Η ομάδα του cancer-free group αποδεικνύεται ομοιογενής ως προς τη μετάλλαξη K-ras. Η K-ras μετάλλαξη εμφάνισε την ίδια συχνότητα μεταξύ των νεοπλασματικών και των φυσιολογικών ιστών στην ομάδα των συμμετεχόντων χωρίς καρκίνο (mt/total=4/23=17,39% vs 4/27=14,81% αντίστοιχα, $p=1$), όπως φαίνεται στους πίνακες 7 και 9, γεγονός που δηλώνει ότι η συμπεριφορά του εντέρου με πολύποδες χωρίς καρκίνο είναι ενιαία, όσον αφορά στη μετάλλαξη K-ras : από όποιο σημείο του εντέρου αυτού λάβουμε ιστικές βιοψίες, η πιθανότητα να ανιχνεύσουμε τη μετάλλαξη K-ras είναι η ίδια (πίνακας 11). Έτσι το έντερο των ατόμων αυτών αντιμετωπίζεται ως εν δυνάμει ενιαία οντότητα : η πιθανότητα να φέρει το έντερο αυτό μετάλλαξη K-ras σε οποιαδήποτε ιστική του περιοχή, δεν διαφέρει είτε αυτή είναι φυσιολογική είτε είναι νεοπλασματική, προσεγγίζει το 15-20% και είναι στατιστικά μεγαλύτερη από την ομάδα ελέγχου (παράγραφοι 4,8 και 11, πίνακας 11, γράφημα 1). Για το λόγο αυτό, το K-ras status ενός φυσιολογικού ιστού από ένα παχύ έντερο της ομάδας αυτής μπορεί κατ' εκτίμηση να προβλέψει το K-ras status του συνυπάρχοντος καλοήθους νεοπλασματικού ιστού από το ίδιο έντερο (παράγραφος 14).

Ιστικές περιοχές	Αριθμός δειγμάτων mt K-ras	Αριθμός δειγμάτων wt K-ras	Ποσοστό παρουσίας της K-ras μετάλλαξης
Ben-Nf	1	11	1/12=8,33 %
Aden-Nn	2	6	2/8=25,00 %
Serr-Nn	1	6	1/7=14,28 %
Ben-Nn	3	12	3/15=20,00 %
Σύνολο φυσιολογικών ιστών	4	23	4/27=14,81 %
Προχωρημένα αδενώματα	3	3	3/6=50,00%
Μη προχωρημένα αδενώματα	0	8	0/8=0,00%
Aden-t	3	11	3/14=21,42%
Serr-t	1	8	1/9=11,11%
Σύνολο νεοπλασματικών ιστών	4	19	4/23=17,4%

Πίνακας 11. Το cancer-free group αποτελεί ενιαία οντότητα ως προς τη μετάλλαξη στο K-ras : Τα ποσοστά των K-ras μεταλλάξεων των φυσιολογικών ιστών δεν διαφέρουν ουσιαστικά όταν συγκριθούν με αυτά των νεοπλασματικών ιστών. Η ερμηνεία των συμβόλων των ιστικών περιοχών αναγράφεται στη σελίδα 76.

21. Στο cancer-bearing group η μετάλλαξη K-ras συμβάλλει στην έναρξη της ογκογένεσης αλλά δεν συμβάλλει στην ανάπτυξη του φαινοτύπου του νεοπλασματος : παρατηρείται αύξηση της συχνότητας της K-ras μετάλλαξης από τον φυσιολογικό μη μεταλλαγμένο (wt K-ras) ιστό στον φυσιολογικό μεταλλαγμένο (mt K-ras) ιστό, αλλά όχι από τον φυσιολογικό μεταλλαγμένο ιστό στους καλοήθεις πολύποδες και στον καρκίνο. Οι φυσιολογικοί ιστοί στο group αυτό έχουν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από την ομάδα ελέγχου (14,70% vs 0%, $p=0,018$). Διαπιστώθηκε όμως το εξής παράδοξο : οι καρκίνοι παρουσίασαν την ίδια συχνότητα K-ras μετάλλαξης σε σχέση με τους καλοήθεις πολύποδες ($p=0,09$), οι καλοήθεις πολύποδες είχαν τις ίδιες K-ras μεταλλάξεις με τους φυσιολογικούς ιστούς (14,70% vs 23,07%, $p=0,66$), αλλά οι καρκίνοι είχαν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς του ίδιου εντέρου (παράγραφος 15). Λόγω των αντικρουόμενων αυτών παρατηρήσεων και της αδυναμίας πρόβλεψης του K-ras status του καρκίνου από το K-ras status του συνυπάρχοντος φυσιολογικού ιστού (παράγραφος 14), προτείνουμε ότι δεν είναι δόκιμο το group αυτό να υπολογισθεί ως οντότητα με ενιαία συμπεριφορά, ως προς τη μετάλλαξη K-ras (γράφημα 2).



Γράφημα 2. Ca-bearing group: η συχνότητα της K-ras μετάλλαξης στις φυσιολογικές και νεοπλασματικές περιοχές του group σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Είναι εμφανής η αύξουσα πορεία του ποσοστού θετικότητας από τον φυσιολογικό ιστό στον καλοήθη πολύποδα και στον καρκίνο, αλλά οι διαφορές μεταξύ των διακριτών σταδίων δεν καταγράφουν στατιστική σημαντικότητα. Οι φυσιολογικοί ιστοί του group αυτού έχουν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από την ομάδα ελέγχου. Αν και στο σύνολο των δειγμάτων στο group αυτό η μετάλλαξη είναι συχνότερη από την ομάδα ελέγχου, το ca-bearing group δεν αντιμετωπίζεται ως ενιαία οντότητα αναφορικά με την K-ras μετάλλαξη. Το K-ras status του φυσιολογικού ιστού από το παχύ έντερο/ορθό από το group αυτό δεν μπορεί να προβλέψει το K-ras status του καρκινικού ιστού από το ίδιο παχύ έντερο/ορθό.

Γαλάζιο χρώμα : ιστοί με μετάλλαξη στο K-ras (mt K-ras).

Κόκκινο χρώμα : ιστοί με φυσιολογικό K-ras (wt K-ras).

22. Συγκρίνοντας ευρύτερες ομάδες ιστικών κατηγοριών, διαπιστώθηκε ότι η ανίχνευση της μετάλλαξης καταγράφει μη σημαντική πτώση στη μετάβαση από το φυσιολογικό μεταλλαγμένο ιστό στο μη προχωρημένο νεόπλασμα, ακολούθως σημαντική άνοδο κατά τη μετατροπή του μη προχωρημένου σε προχωρημένο νεόπλασμα, και, τέλος, μη σημαντική πτώση κατά την μεταστατική εξάλλαγή του καρκίνου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι :

- 1) Οι οδοντωτές αλλοιώσεις φέρουν την K-ras μετάλλαξη το ίδιο συχνά με τα μη προχωρημένα κλασικά αδενώματα (παράγραφος 10),
- 2) Όλες οι οδοντωτές αλλοιώσεις της μελέτης μας ταξινομήθηκαν στα μη προχωρημένα νεοπλάσματα (παράγραφος 10),
- 3) Τα προχωρημένα κλασικά αδενώματα έχουν διαφορετική μοριακή συμπεριφορά από τα μη προχωρημένα κλασικά αδενώματα (παράγραφος 9),
- 4) Τα προχωρημένα κλασικά αδενώματα φέρουν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από τις οδοντωτές αλλοιώσεις (παράγραφος 10),
- 5) Αυτή η διαφορετικότητα δεν αντικατοπτρίζεται στα γραφήματα 1 και 2,
- 6) Τα επιμέρους συμπεράσματα για την εξέλιξη της K-ras μετάλλαξης στο cancer-bearing group είναι αντικρουόμενα (παράγραφος 21),
- 7) Τα προχωρημένα αδενώματα συμπεριφέρονται, ως προς τη μετάλλαξη K-ras, όπως ο καρκίνος (παράγραφος 18),
- 8) Οι διάφορες κατηγορίες, υποκατηγορίες και υπερκατηγορίες φυσιολογικών ιστών είχαν ίσες K-ras μεταλλάξεις μεταξύ τους (παράγραφος 4, πίνακας 7),
- 9) Οι φυσιολογικοί ιστοί από κάθε group ασθενών είχαν περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από την ομάδα ελέγχου (παράγραφος 5),
- 10) Η πρόοδος της συχνότητας της K-ras μετάλλαξης στις ιστικές ομάδες των δύο groups δεν ανέδειξε σαφές μοντέλο εξέλιξης της μετάλλαξης στην ορθοκολική καρκινογένεση (πίνακες 11-12, γραφήματα 1 και 2),

κατηγοριοποιήσαμε εκ νέου τους ιστούς, με σκοπό να περιγράψουμε ένα μοντέλο που να ισχύει και στα δύο groups. Συγχωνεύσαμε σε ενιαία κατηγορία τους ιστούς τόσο των μη προχωρημένων αδενωμάτων μαζί με τις οδοντωτές αλλοιώσεις (**κατηγορία Β, μη προχωρημένα νεοπλάσματα**) όσο και των προχωρημένων αδενωμάτων μαζί τους καρκινικούς (**κατηγορία Γ, προχωρημένα νεοπλάσματα**). Η **κατηγορία Α** ήταν οι φυσιολογικοί ιστοί κάθε ομάδας και η **κατηγορία Δ** οι μεταστατικοί ιστοί. Τέλος, συγκρίναμε τα ακόλουθα ζεύγη ιστών : C vs A, A vs B, B vs Γ και Γ vs Δ. Βλέπε πίνακα 13.

Στο **Ca-free group**, η κατηγορία Γ περιείχε προχωρημένα αδενώματα (δεν υπήρχε καρκίνος). Κατηγορία Δ δεν υπήρχε. Τα ποσοστά θετικότητας ανά κατηγορία ήταν : A= 14,81%, B= 5,88% και Γ=50%. Μεταξύ των κατηγοριών Α και Β η διαφορά δεν ήταν σημαντική ($p=0,63$), ενώ παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων Β και Γ ($p=0,04$) και μεταξύ των κατηγοριών Α και Γ ($p=0,024$). Βλέπε γράφημα 3 και πίνακα 13.

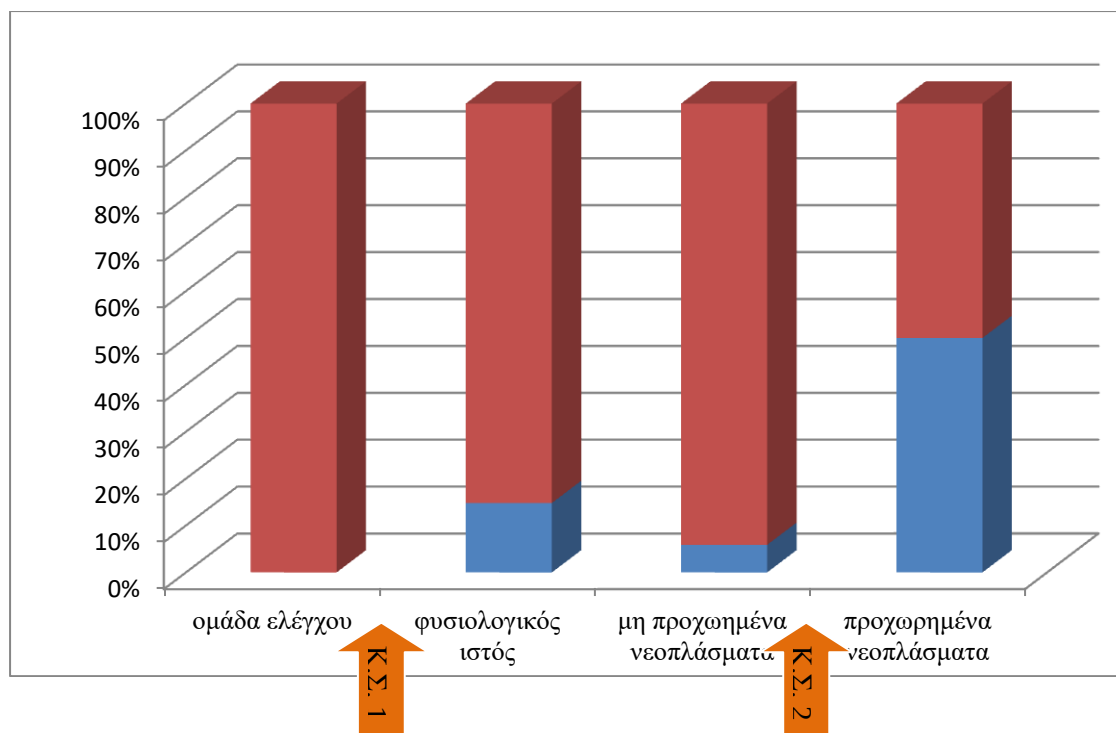
Στο **Ca-bearing group**, τα ποσοστά θετικότητας ανά κατηγορία ήταν : A= 14,75%, B= 7,7%, Γ=52,94% και Δ=42,85%. Η σπανιότερη ανίχνευση της μετάλλαξης στην κατηγορία Δ σε σχέση με την κατηγορία Γ πιθανόν να εξηγείται από την απώλεια του ενός αλληλίου του K-ras στην όσιμη καρκινογένεση¹⁸⁰ και από τη μεγαλύτερη συχνότητα της K-ras μετάλλαξης στους καρκινικούς ορθοκολικούς ιστούς της μελέτης σε σχέση τη βιβλιογραφία (37,7-50%^{179,181}). Οι κατηγορίες Α (mt/total=5/34) και Β (mt/total=1/9) είχαν ίσες μεταλλάξεις ($p=1$). Ομοίως και οι κατηγορίες Γ (mt/total=15/28) και Δ (mt/total=3/7) ($p=0,69$). Τα προχωρημένα νεοπλάσματα είχαν οριακά περισσότερες μεταλλάξεις από τα μη προχωρημένα ($p=0,05011$). Μεταξύ Α και Γ η διαφορά είναι σημαντική ($p=0,018$) (γράφημα 4 και πίνακας 13).

Ιστικές περιοχές	Ποσοστά μεταλλάξεων K-ras cancer-bearing bowel	Ποσοστά μεταλλάξεων K-ras cancer-free bowel	Ποσοστά μεταλλάξεων K-ras συνολικά
Ben-NF	---	8,33 %	8,33 %
Ca-NF	9,10 %	---	9,10 %
Aden-NN	0,00%	25,00 %	20,00 %
Serr-NN	---	14,28%	14,28 %
Ca-NN	19,05%	---	19,05 %
Φυσιολογικοί ιστοί	14,70%	14,81%	14,75%
Aden-t	25,00 %	21,42%	22,72 %
Serr-t	20,00 %	11,11%	14,28 %
Ca-t	54,16%	---	54,16 %
Meta-t	42,85%	---	42,85 %
Καλοήθεις νεοπλασματικοί ιστοί	23,07%	17,40%	19,44%
Κακοήθεις νεοπλασματικοί ιστοί	51,61%	---	51,61%
Νεοπλασματικοί ιστοί	43,18%	17,40%	34,33%
Σύνολο ιστών	30,77 %	16,00%	25,00 %

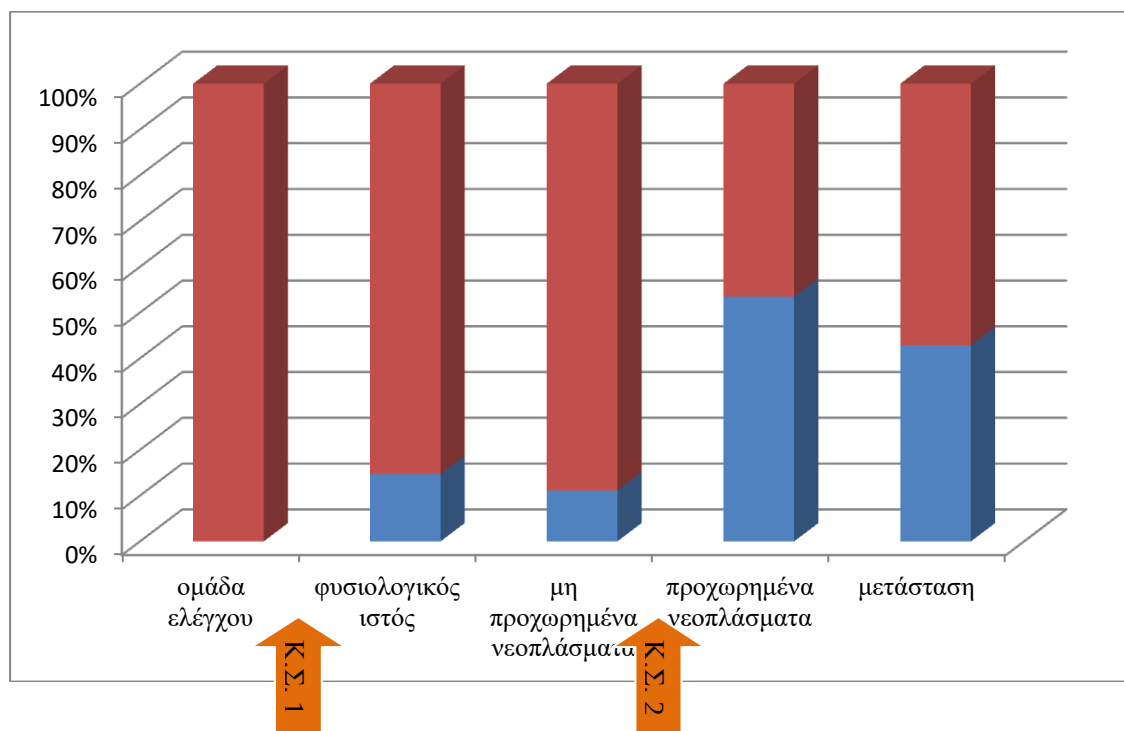
Πίνακας 12 : Τα ποσοστά των μεταλλάξεων του K-ras στις διαφορετικές ομάδες των ιστικών περιοχών του cancer-bearing και του cancer-free group. Η ερμηνεία των συμβόλων των ιστικών περιοχών αναγράφεται στη σελίδα 76.

Κωδικός	Κατηγορία	Ιστοί	Ca-free group	Ca-bearing group	Polyp-bearing group	
C	Φυσιολογικός βλεννογόνος φυσιολογικού κόλου	Φυσιολογικός μη μεταλλαγμένος βλεννογόνος	0,00% (0/39)	0,00% (0/39)	0,00% (0/39)	
A	Φυσιολογικός βλεννογόνος	Φυσιολογικός μεταλλαγμένος βλεννογόνος	14,81% (4/27)	14,70% (5/34)	14,75% (9/61)	Κ.Σ. 1
B	Μη προχωρημένα νεοπλάσματα	Μη προχωρημένα αδενώματα μαζί με οδοντωτές αλλοιώσεις	5,88% (1/17)	11,11% (1/9)	7,70% % (2/26)	
Γ	Προχωρημένα νεοπλάσματα	Προχωρημένα αδενώματα μαζί με καρκίνο	50,00% (3/6)	53,57% (15/28)	52,94% (18/34)	Κ.Σ. 2
Δ	Μετάσταση	Μεταστατικός ιστός	---	42,85% (3/7)	42,85 % (3/7)	

Πίνακας 13. Η ευρύτερη ομαδοποίηση των ιστών και η σύγκριση με την ομάδα ελέγχου αναδεικνύει κλιμακούμενη αύξηση στη συχνότητα της *K-ras* μετάλλαξης. Όταν οι ιστικές περιοχές ομαδοποιηθούν σε ευρύτερες κατηγορίες, παρατηρείται μία προοδευτική αύξηση των ποσοστών της μετάλλαξης στο *K-ras*, η οποία παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα τόσο κατά τη μετάβαση από τον φυσιολογικό μη μεταλλαγμένο βλεννογόνο (C=control group) στον φυσιολογικό μεταλλαγμένο βλεννογόνο (A) (**κομβικό σημείο 1=Κ.Σ. 1**) όσο και κατά την μετάβαση από την ομάδα με τα μη προχωρημένα νεοπλάσματα (B) στην ομάδα με τα προχωρημένα νεοπλάσματα (Γ) (**κομβικό σημείο 2=Κ.Σ. 2**). Η παρατήρηση αυτή έχει ισχύ στο cancer-free group, στο cancer-bearing group και στο σύνολο των συμμετεχόντων στην έρευνα. Οι κατηγορίες με ίδια σκίαση αντιστοιχούν σε βλεννογόνους που, στατιστικά, έχουν την ίδια πιθανότητα να φέρουν μετάλλαξη στο *K-ras*. Η μετάβαση από ένα πλαίσιο σκίασης σε αυτό με την αμέσως πιο έντονη σκίαση σηματοδοτείται από ένα εκ των δύο κομβικών σημείων. Η χρονική τοποθέτηση κάθε ενός κομβικού σημείου στην αλληλουχία των γεγονότων της ορθοκολικής καρκινογένεσης είναι η ίδια στο cancer-free group, στο cancer-bearing group και στο σύνολο των συμμετεχόντων : η παθογενετική σημασία της μετάλλαξης *K-ras* στην ορθοκολική ογκογένεση είναι η ίδια, ανεξάρτητα εάν τελικά αυτή θα καταλήξει σε καρκίνο ή όχι.



Γράφημα 3. Στο cancer-free group η συχνότητα της K-ras μετάλλαξης παρουσιάζει δύο σημαντικές κομβικές αυξήσεις : από το φυσιολογικό μη μεταλλαγμένο στο φυσιολογικό μεταλλαγμένο βλεννογόνο (Κ.Σ. 1) και κατά την εξέλιξη του μη προχωρημένου σε προχωρημένο νεόπλασμα (Κ.Σ. 2).



Γράφημα 4. Στο cancer-bearing group η συχνότητα της K-ras μετάλλαξης παρουσιάζει δύο σημαντικές κομβικές αυξήσεις : από το φυσιολογικό μη μεταλλαγμένο στο φυσιολογικό μεταλλαγμένο βλεννογόνο (Κ.Σ. 1) και κατά την εξέλιξη του μη προχωρημένου σε προχωρημένο νεόπλασμα (Κ.Σ. 2).

Γαλάζιο χρώμα : ιστοί με μετάλλαξη στο K-ras (mt K-ras).

Κόκκινο χρώμα : ιστοί με φυσιολογικό K-ras (wt K-ras).

23. Το cancer-free group και το cancer-bearing group, παρά τις διαφορές τους, έχουν πολλές ομοιότητες, που μας επιτρέπουν να ενοποιήσουμε τα δύο groups και να τα θεωρήσουμε από κοινού ως μία, ενιαία ομάδα, με κοινό μοντέλο καρκινογένεσης και με ενιαία ογκογενετική συμπεριφορά του φυσιολογικού ορθοκολικού βλεννογόνου.

Οι **ομοιότητες** ανάμεσα στις δύο ομάδες (cancer-free group, cancer-bearing group) είναι οι ακόλουθες:

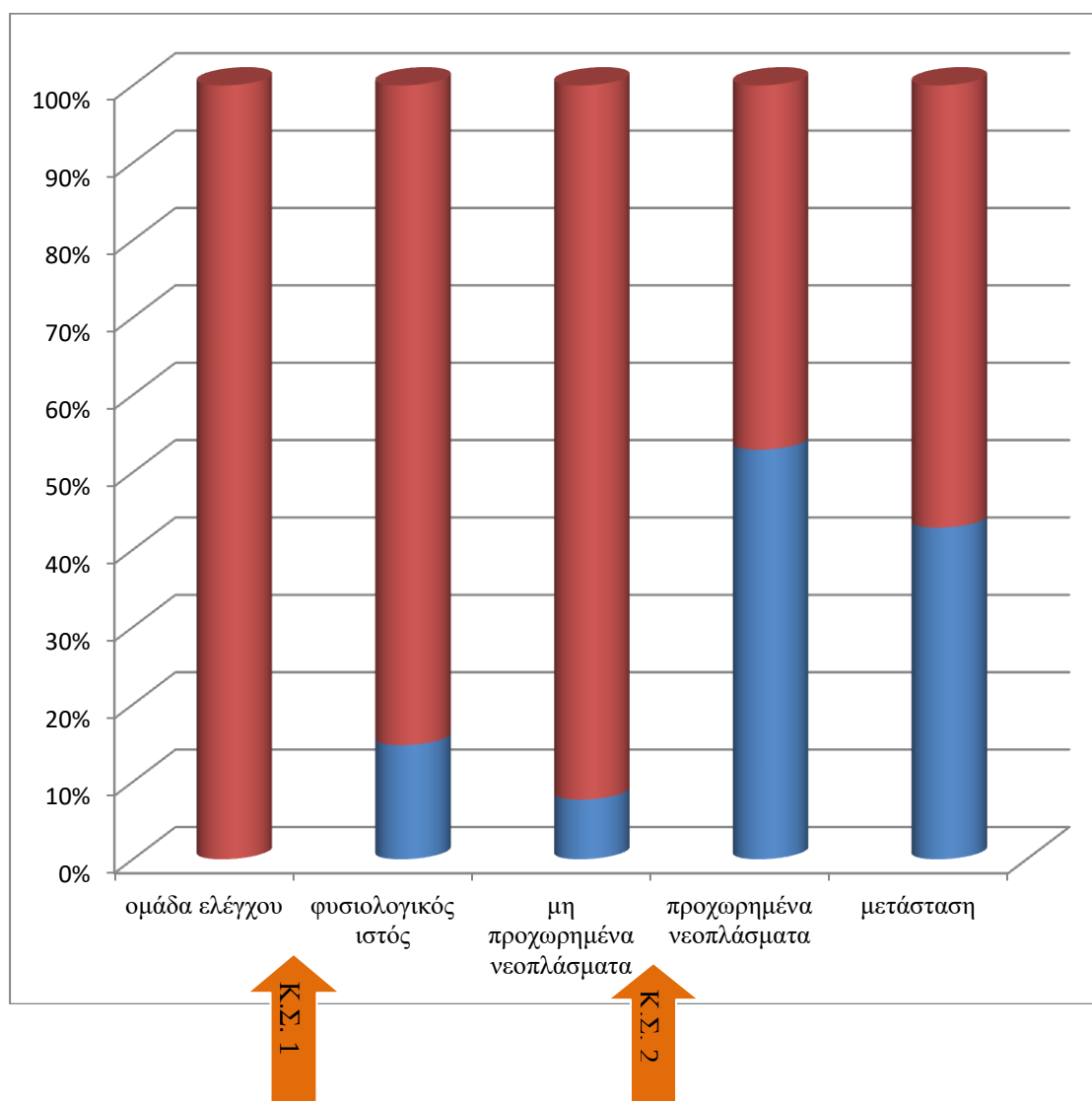
- i) η πιθανότητα ο φυσιολογικός ορθοκολικός τους ιστός να φέρει μετάλλαξη στο K-ras είναι παρεμφερής, περίπου 15% (παράγραφος 4)
- ii) η πιθανότητα ένα μέλος από κάθε ομάδα (ασθενής ή όχι) να έχει K-ras μετάλλαξη στο φυσιολογικό ορθοκολικό του ιστό είναι όμοια, περίπου 20% (παράγραφος 8)
- iii) η πιθανότητα οι καλοήθεις ορθοκολικοί πολύποδες να φέρουν μετάλλαξη στο K-ras είναι περίπου η ίδια, περίπου 20% (παράγραφος 11)
- iv) η πιθανότητα το παχύ έντερο/ορθό συνολικά να φέρει μετάλλαξη στο K-ras *δεν υπερέχει* στο ca-bearing έναντι του ca-free group (έστω και οριακά, η υπεροχή του ca-bearing group δεν είναι στατιστικά σημαντική) (παράγραφος 7)
- v) η μετάλλαξη K-ras έχει την ίδια συνεισφορά στην έναρξη της διαδικασίας της ορθοκολικής ογκογένεσης, ανεξάρτητα εάν θα καταλήξει σε καρκίνο (παράγραφοι 19 και 21, πίνακας 13)
- vi) η μετάλλαξη K-ras δεν συμβάλλει στην μετάβαση από το φυσιολογικό μεταλλαγμένο βλεννογόνο σε πρώιμο νεόπλασμα (παράγραφοι 19-22)
- vii) η μετάλλαξη K-ras συμβάλλει στην μετάβαση από το μη προχωρημένο νεόπλασμα στο προχωρημένο (παράγραφοι 9 και 22)
- viii) η μετάλλαξη K-ras δεν συμβάλλει στην μετάβαση από το προχωρημένο νεόπλασμα στη μετάσταση (παράγραφος 17)
- ix) το μοντέλο καρκινογένεσης είναι κοινό : τα δύο κομβικά σημεία στην πορεία της ογκογένεσης, στην περίπτωση που το πρωτοογκογονίδιο K-ras είναι μεταλλαγμένο, είναι ακριβώς τα ίδια (παράγραφοι 20,21, γραφήματα 3 και 4)

Λόγω των ομοιοτήτων αυτών, θεωρήσαμε ότι είναι θεμιτό να **ενοποιήσουμε** τις δύο ομάδες σε μία, την ομάδα που φέρει ορθοκολικούς πολύποδες (**polyp-bearing bowel**). Συγχωνεύσαμε τις αντίστοιχες κατηγορίες (πχ τη B στο ca-free group με τη B στο ca-bearing group) και διαπιστώνουμε ότι το μοτίβο δεν αλλάζει : οι διαφορές στη θετικότητα του K-ras μεταξύ των κατηγοριών Α και Β δεν είναι σημαντικές ($p=0,49$), οι διαφορές στη θετικότητα του K-ras μεταξύ των κατηγοριών Γ και Δ δεν είναι σημαντικές (0,69), η κατηγορία Γ έχει περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από την κατηγορία Β ($p<0,001$), και, τέλος, η κατηγορία Α φέρει περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από την κατηγορία C ($p=0,01$).

Στην ενιαία ομάδα (polyp-bearing bowel), όπως είναι εμφανές στον πίνακα 13 και στο γράφημα 5, αναγνωρίζονται τα ίδια κρίσιμα κομβικά σημεία (**Κ.Σ**) μετάβασης στην πορεία της ορθοκολικής καρκινογένεσης, τα οποία αναγνωρίζονται και σε κάθε ομάδα χωριστά(γραφήματα 3 και 4, πίνακας 13). Η μετάλλαξη K-ras διαδραματίζει καίριο ρόλο, συμβάλλοντας σε αμφότερες τις μεταβάσεις αυτές στην ενιαία ομάδα, όπως συμβαίνει και σε κάθε ομάδα χωριστά. Τα κομβικά σημεία μετάβασης είναι τα εξής :

Κ.Σ. 1 (κομβικό σημείο 1) : πολύ πρώιμα, κατά τη μετατροπή του φυσιολογικού μη μεταλλαγμένου βλεννογόνου (wt K-ras) σε φυσιολογικό μεταλλαγμένο βλεννογόνο (mt K-ras)

Κ.Σ. 2 (κομβικό σημείο 2) : όψιμα, κατά τη μετατροπή του μη προχωρημένου νεοπλασματος σε προχωρημένο.



Γράφημα 5. Polyp-bearing bowel : πανόραμα της εξέλιξης της συχνότητας της K-ras μετάλλαξης (mt K-ras) στο σύνολο των συμμετεχόντων στη μελέτη, βάσει της ευρύτερης κατηγοριοποίησης των ιστών. Η μετάλλαξη K-ras παρουσιάζει τις ίδιες σημαντικές κομβικές αυξήσεις (Κ.Σ. 1 και Κ.Σ. 2), όπως αυτές περιγράφηκαν σε κάθε ομάδα ασθενών χωριστά (γραφήματα 3 και 4).

Γαλάζιο χρώμα : ιστοί με μετάλλαξη στο K-ras (mt K-ras).
Κόκκινο χρώμα : ιστοί με φυσιολογικό K-ras (wt K-ras).

11. Ποιες είναι οι καινοτομίες της παρούσας έρευνας ;

Η παρούσα μελέτη, με τα προαναφερθέντα συμπεράσματα, ανέδειξε αρκετά δεδομένα που αφορούν στην διαδικασία της σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης · μερικά εξ' αυτών είναι ήδη γνωστά από τη διεθνή βιβλιογραφία. Τα πρωτότυπα δεδομένα της έρευνας που αφορούν στην ορθοκολική καρκινογένεση, όταν απουσιάζει το κληρονομικό ιστορικό ορθοκολικού καρκίνου, είναι τα ακόλουθα :

- i) Για πρώτη φορά μελετήθηκαν ταυτόχρονα όλα τα αλληλοδιάδοχα ενδιάμεσα στάδια της ορθοκολικής καρκινογένεσης από τον φυσιολογικό έως και το μεταστατικό ιστό (φυσιολογικός ιστός, μη προχωρημένο νεόπλασμα, προχωρημένο νεόπλασμα, καρκίνος, μετάσταση).
- ii) Είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκαν δείγματα από τις τρεις διαφορετικές περιοχές του κόλου (δεξιό κόλον, αριστερό κόλον, ορθό) σε ομάδα ελέγχου και στην οποία αποδείχθηκε ότι η μετάλλαξη *K-ras* απουσιάζει πλήρως από βλεννογόνο απόλυτα φυσιολογικού παχέος εντέρου και ορθού, ο οποίος είναι ταυτόχρονα ενδοσκοπικά και ιστολογικά φυσιολογικός.
- iii) Δείχθηκε ότι ο φυσιολογικός ιστός (ταυτόχρονα ενδοσκοπικά **και** ιστολογικά) από ορθό/παχύ έντερο με καλοήθεις πολύποδες χωρίς καρκίνο είναι δυνατό να φέρει *K-ras* μεταλλάξεις.
- iv) Αποδείχθηκε ότι ο φυσιολογικός ιστός (ταυτόχρονα ενδοσκοπικά και ιστολογικά) από ορθό/παχύ έντερο με καλοήθεις πολύποδες φέρει τη μετάλλαξη *K-ras* σε σημαντικό ποσοστό, το οποίο είναι το ίδιο, είτε στο έντερο αυτό υπάρχει καρκίνος ή όχι· οι *K-ras* μεταλλάξεις είναι, σε κάθε περίπτωση, στατιστικά περισσότερες από την ομάδα ελέγχου.
- v) Δείχθηκε ότι όλες οι κατηγορίες, οι υποκατηγορίες και οι υπερκατηγορίες φυσιολογικών ιστών σε ένα κόλον με πολύποδες έχουν την ίδια πιθανότητα να φέρουν την μετάλλαξη *K-ras*, ανεξάρτητα εάν το κόλον αυτό έχει καρκίνο ή όχι.
- vi) Δείχθηκε ότι οι καλοήθεις πολύποδες του παχέος εντέρου/ορθού έχουν την ίδια πιθανότητα με τους φυσιολογικούς ιστούς του ίδιου κόλου να φέρουν μετάλλαξη στο ογκογονίδιο *K-ras* · αυτή η παρατήρηση ισχύει ανεξάρτητα από τη παρουσία ή όχι καρκίνου στο κόλον αυτό.
- vii) Αναδείχθηκε η ομοιογένεια, ως προς τη μετάλλαξη *K-ras*, ενός εντέρου με καλοήθεις πολύποδες μόνο : η πιθανότητα να φέρει το έντερο αυτό μετάλλαξη *K-ras* σε οποιαδήποτε ιστική του περιοχή, δεν διαφέρει, είτε αυτή είναι φυσιολογική είτε είναι νεοπλασματική και αυτή η πιθανότητα είναι μεγαλύτερη από το κόλον του γενικού φυσιολογικού πληθυσμού.
- viii) Αποδείχθηκε ότι το *K-ras* status ενός καλοήθους πολύποδα, μπορεί να προβλεφθεί με σχετική ασφάλεια από το *K-ras* status του συνυπάρχοντος φυσιολογικού ιστού, εφόσον στο έντερο απουσιάζει ο καρκίνος. Αντιθέτως, το *K-ras* status ενός ορθοκολικού καρκίνου δεν μπορεί να προβλεφθεί από το *K-ras* status του συνυπάρχοντος φυσιολογικού ιστού από το ίδιο έντερο.
- ix) Τέθηκε ισχυρή υποψία ότι η μετάλλαξη στο *K-ras* εμφανίζεται αρκετά πρώιμα στην πορεία της ογκογένεσης στο παχύ έντερο : 1^ο, οι φυσιολογικοί ιστοί που βρίσκονται σε απόσταση από τα καλοήθη ή/και τα κακοήθη νεοπλάσματα έχουν την ίδια πιθανότητα να φέρουν τη μετάλλαξη με την ομάδα ελέγχου, αλλά οι φυσιολογικοί ιστοί πλησίον των καλοήθων ή/και των κακοήθων νεοπλασμάτων έχουν περισσότερες μεταλλάξεις *K-ras* σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και 2^ο, η ομάδα

με τους ορθοκολικούς καρκίνους δεν είχε περισσότερες μεταλλάξεις από την ομάδα με τους καλοήθεις ορθοκολικούς πολύποδες

- x) Τεκμηριώθηκε ότι η πρόωμη απόκτηση της σωματικής *K-ras* μετάλλαξης είναι κρίσιμη για τη επαγωγή της καρκινογένεσης στον βλεννογόνο του παχέος εντέρου και του ορθού, αλλά όχι για την ανάπτυξη του πρώιμου νεοπλάσματος : αρχικά, παρότι ο ιστολογικά και ενδοσκοπικά φυσιολογικός ορθοκολικός βλεννογόνος αποκτά τη μετάλλαξη, η οποία και εκκινεί τη διαδικασία της ογκογένεσης, παραμένει ιστολογικά και ενδοσκοπικά φυσιολογικός, ενώ στην πορεία, αν και δεν αποκτά περισσότερες *K-ras* μεταλλάξεις, εξελίσσεται σε μη προχωρημένο νεόπλασμα, προφανώς υπό την επήρεια άλλων γενετικών τροποποιήσεων.
- xi) Τέθηκε η ένδειξη ότι ο φυσιολογικός βλεννογόνος από ένα έντερο που περιέχει αποκλειστικά καλοήθεις πολύποδες έχει την ίδια ογκογενετική συμπεριφορά με τον φυσιολογικό βλεννογόνο ενός παχέος εντέρου/ορθού με καρκίνο. Επειδή η μετάλλαξη *K-ras* στο φυσιολογικό βλεννογόνο του κόλου με καρκίνο υποδηλώνει την μελλοντική ανάπτυξη νέου καρκίνου στο ίδιο έντερο, τέθηκε η υποψία ότι η μετάλλαξη *K-ras* στο φυσιολογικό βλεννογόνο του εντέρου με πολύποδες είναι ένας πρώιμος προγνωστικός βιοδείκτης για την μελλοντική ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου στο έντερο αυτό.

12.Είναι εφικτό η παρούσα έρευνα να τροποποιήσει το αποδεκτό πρότυπο σε υποομάδα ορθοκολικής καρκινογένεσης ;

Το ογκογονίδιο *K-ras* πρωτοανακαλύφθηκε σε ρετροϊούς τη δεκαετία του 1960 και, στη δεκαετία του 1970 συσχετίστηκε αιτιολογικά με τους ανθρώπινους καρκίνους⁹⁴. Κατά τη δεκαετία του 1980 τεκμηριώθηκε η συνεισφορά του στην ανθρώπινη ορθοκολική καρκινογένεση, σποραδική και οικογενή^{94,183-186}. Τη διετία 1988-1990 προτάθηκε από τους Vogelstein και Fearon το μοντέλο της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και το ορθό, σύμφωνα με το οποίο η πορεία της ορθοκολικής καρκινογένεσης από το φυσιολογικό βλεννογόνο μέχρι και τη μετάσταση διέρχεται από διακριτά ενδιάμεσα στάδια κατά τα οποία συμβαίνουν συγκεκριμένες μοριακές αλλαγές^{27,67}. Το μοντέλο αυτό επιβεβαιώθηκε στο μεγαλύτερο μέρος του από ερευνητές που διερεύνησαν τη σειρά των μοριακών και ιστολογικών αλλαγών στα διαδοχικά στάδια της καρκινογένεσης και είναι επομένως ευρέως αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα μέχρι και σήμερα. Έκτοτε, πολυάριθμες μελέτες έχουν αναδείξει την ταυτόχρονη παρουσία των *K-ras* μεταλλάξεων σε ορθοκολικό καρκίνο και στον συνυπάρχοντα φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο κοντά ή σε απόσταση από τον ορθοκολικό καρκίνο^{63,117,121,125,137-138,152,156-159}. Παρόλα αυτά οι μέχρι τούδε πειραματικές και κλινικές έρευνες έχουν μελετήσει είτε τη μετάβαση από ένα συγκεκριμένο στάδιο στο διάδοχό του είτε την ταυτόχρονη καταγραφή μοριακών/γενετικών δεδομένων σε κάποια από τα διακριτά στάδια της διαδικασίας καρκινογένεσης στο ίδιο κόλον.

Δύο προηγηθείσες εργασίες είχαν δώσει αντικρουόμενες ενδείξεις όσον αφορά στην παρουσία *K-ras* μετάλλαξης σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο από φυσιολογικά άτομα χωρίς πολύποδες ή καρκίνο στο έντερό τους : η μεν¹⁵⁶ έδειξε ότι υπάρχει πιθανότητα ανεύρεσης της μετάλλαξης στον φυσιολογικό βλεννογόνο, αλλά δεν καθιστούσε σαφές εάν ο βλεννογόνος παρουσίαζε ευρήματα φλεγμονής στην ιστολογική εξέταση, η δε¹⁴⁵ αποδείκνυε ότι η μετάλλαξη απουσίαζε από 90 ιστικές περιοχές από 15 φυσιολογικά έντερα, αλλά δεν καθιστούσε σαφές εάν στις περιοχές αυτές απουσίαζε ιστολογικά κάθε είδους παθολογία, παρά ανέφερε μόνο την απουσία καρκινικών και προκαρκινικών βλαβών. Επίσης έχει δειχθεί η παρουσία της μετάλλαξης σε εντερικό κομπρανόδες περιεχόμενο μετά από πλύσεις του εντέρου¹⁴⁹ και στα κόπρανα¹⁵⁰ από άτομα με καλοήγη ορθοκολικά αδενώματα και σε κόπρανα πασχόντων από ορθοκολικό καρκίνο¹⁸⁷. Τέλος έχει πολλάκις αποδειχθεί^{109,138,156,173} ότι ο φυσιολογικός βλεννογόνος από έντερο με ορθοκολικό καρκίνο μπορεί να φέρει τη μετάλλαξη *K-ras*, με το ποσοστό θετικότητας να κυμαίνεται από 5% έως 25 %¹⁵⁷. Σε μερικές μάλιστα εργασίες, όπως αυτή των Zhu και συνεργατών¹²⁵, δείχθηκε αυτό που και η δική μας μελέτη ανέδειξε, ότι δηλαδή δεν υπάρχει υποχρεωτικά συμφωνία στο *K-ras* status μεταξύ του καρκινικού και του συνυπάρχοντος φυσιολογικού ιστού.

Οι μέχρι τώρα μελέτες σε φυσιολογικούς ιστούς πειραματοζώων και ανθρώπων με ορθοκολικό καρκίνο είχαν δείξει ότι η παρουσία της *K-ras* μετάλλαξης σε ένα πολύ πρώιμο στάδιο ήταν δηλωτική ότι η ογκογόνος διαδικασία είχε ήδη ξεκινήσει^{67,79,138,145,156,191}. Σε πειραματόζωα η *K-ras* μετάλλαξη ήταν ο συνδετικός κρίκος μεταξύ αιτίου (καρκινογόνου) και αποτελέσματος (νεοπλασία)¹⁹¹. Μολονότι η μετάλλαξη *K-ras* δεν είναι επαρκής συνθήκη να οδηγήσει σε πλεονέκτημα νεοπλασματικής αύξησης^{117,120,125,137}, έχει τη δυνατότητα να θέσει τον φυσιολογικό ιστό σε αυξημένο κίνδυνο να μεταμορφωθεί σε καρκινικό^{117,125,138}, εφόσον τα *K-ras* μεταλλαγμένα κύτταρα είναι επιρρεπή να αποκτήσουν επιπρόσθετες γενετικές αλλαγές, απολύτως απαραίτητες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό¹¹⁷. Η πολύ πρώιμη οδηγός σημειακή μετάλλαξη *K-ras* δείχνει ότι μία μη αντιστρεπτή διαδικασία έχει ξεκινήσει (initiation)^{63,117}, ενώ η πρώιμη μετάλλαξη *K-ras* έχει βρεθεί, επιπλέον, ότι προωθεί

(promotes) την ορθοκολική καρκινογένεση ¹³⁹. Έτσι, σε μακροχρόνια παρακολούθηση (follow-up) πασχόντων με ορθοκολικό καρκίνο αποδείχθηκε ότι η παρουσία της μετάλλαξης στον συνυπάρχοντα φυσιολογικό βλεννογόνο προδικάζει την μελλοντική ανάπτυξη καρκίνου στο ίδιο έντερο⁴⁹, γεγονός που υπογραμμίζει την προγνωστική σημασία της K-ras μετάλλαξης στον φυσιολογικό βλεννογόνο.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη, σύμφωνα με την λεπτομερή αναδίφηση της αγγλόφωνης βιβλιογραφίας, κατά την οποία μελετώνται ταυτόχρονα όλα τα διαδοχικά ενδιάμεσα ιστολογικά στάδια, που εμπλέκονται στην πορεία της ανθρώπινης ορθοκολικής καρκινογένεσης, αναφορικά με συγκεκριμένο μοριακό γεγονός, εν προκειμένω τη μετάλλαξη του πρωτοογκογονιδίου K-ras. Επίσης είναι η πρώτη μελέτη, κατά την οποία μελετάται η εξέλιξη της μετάλλαξης K-ras σε όλα τα στάδια της ορθοκολικής καρκινογένεσης, τόσο σε κόλον που δεν φέρει καρκίνο, όσο και σε κόλον με παρουσία καρκίνου.

Για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων και κλινικά χρήσιμων συμπερασμάτων, λάβαμε αρκετά προληπτικά μέτρα και χρησιμοποιήσαμε διάφορες τεχνικές, προκειμένου να υπερβούμε τις τεχνικές και άλλες δυσκολίες που παρουσιάζει η ανίχνευση της μετάλλαξης K-ras στο φυσιολογικό και στο νεοπλασματικό ορθοκολικό βλεννογόνο. Συγκεκριμένα :

- 1) Βασίσαμε την έρευνά μας κυρίως σε ορθοκολικό ιστό που ελήφθη κατά τη διάρκεια κολονοσκόπησης με λαβίδα βιοψίας ή με βρόχο πολυπεκτομής, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι τα ορθοκολικά ιστικά δείγματα που λαμβάνονται μέσω της κολονοσκόπησης είναι το ίδιο αξιόπιστα για μοριακή ανάλυση με αυτά των χειρουργικά εξαιρεθέντων ιστών ¹⁸⁸.
- 2) Αποφασίσαμε και αποδώσαμε μεγάλη σπουδαιότητα τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις νεοπλασματικές ιστικές περιοχές, όπως καθίσταται εμφανές από τον αριθμό των ιστικών δειγμάτων (200 ευμεγέθη φυσιολογικά ιστικά δείγματα, 134 ευμεγέθη νεοπλασματικά ιστικά δείγματα, πίνακας 1).
- 3) Τα ιστοτεμαχίδια, όσον αφορά το status του K-ras, δεν είναι αντιπροσωπευτικά ολόκληρου του ορθοκολικού βλεννογόνου ¹³⁸ αλλά μόνο της περιοχής που έχει ληφθεί η βιοψία^{137,189}, διότι η K-ras μετάλλαξη δεν παρουσιάζει ομοιογενή κατανομή καθόλη την έκταση του ορθοκολικού βλεννογόνου ¹³⁷. Αντιθέτως είναι μία *de novo* μετάλλαξη, με εμβλαωματική κατανομή στο κόλον ^{138,156,157}, η παρουσία της οποίας σε συγκεκριμένο σημείο του παχέος εντέρου είναι ανεξάρτητη από την παρουσία της σε άλλο σημείο του ίδιου εντέρου. Έγινε προσπάθεια να ξεπερασθεί αυτή η ανομοιογένεια, λαμβάνοντας δείγματα από τρεις φυσιολογικές ιστικές περιοχές σε κάθε έντερο της ομάδας ελέγχου και αποκτώντας μεγάλο όγκο ιστού ανά ιστική περιοχή (εφόσον υπάρχει η μετάλλαξη, η πιθανότητα ανεύρεσής της είναι 20% όταν λαμβάνεται ένα ιστικό δείγμα και 90% όταν λαμβάνονται δέκα ιστικά δείγματα ¹⁵⁷). Αυτό έγινε εφικτό χρησιμοποιώντας jumpo λαβίδα βιοψίας, με την οποία αποκτάται μία ευρεία, ενιαία, άκοπη περιοχή του ορθοκολικού βλεννογόνου, με τρία ευμεγέθη ιστοτεμαχίδια ανά δείγμα σε μία λήψη, αντί να γίνονται πολλαπλές μικρές λήψεις. Έτσι κάθε δείγμα περιελάμβανε ιστικό όγκο, που αντιστοιχούσε στον όγκο περίπου δέκα συνηθισμένων ιστοτεμαχιδίων της κλασικής λαβίδας βιοψίας.
- 4) Οι διαδικασίες ογκογένεσης σε δύο διακριτά σημεία του κόλου είναι μεταξύ τους ανεξάρτητες, αναπαριστώσες το αποτέλεσμα της επίδρασης διαφορετικών αιτιολογικών παραγόντων σε διαφορετικές ορθοκολικές περιοχές σε διαφορετικές χρονικές στιγμές¹³⁷, γεγονός που είχε επισημανθεί και από τον Vogelstein το 1988 ⁶⁷ και το οποίο εξηγεί τις περιπτώσεις όπου η K-ras μετάλλαξη απουσιάζει σε καρκίνο κόλου, ενώ ταυτόχρονα είναι παρούσα στο φυσιολογικό βλεννογόνο του ίδιου εντέρου ¹³⁷ (κάτι που απέδειξε και η έρευνά μας).

- 5) Η *K-ras* μετάλλαξη μπορεί να συμβεί πολύ πρώιμα κατά την πορεία της ογκογένεσης^{79,189}. Στην περίπτωση αυτή ανιχνεύεται δυνητικά στον φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο. Επειδή ο φυσιολογικός ιστός έχει περιορισμένη έκθεση σε καρκινογόνα σε κάποια δεδομένη στιγμή¹⁸⁹, η συχνότητα των μεταλλαγμένων *K-ras* αλληλίων σε φυσιολογικό βλεννογόνο κόλου (όταν η μετάλλαξη είναι παρούσα) αντιστοιχεί σε περίπου 1/100 έως 1/1000 της συχνότητάς της σε νεοπλασματικό ιστό κόλου¹⁵⁷. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να ανιχνεύουμε την πρώιμη μετάλλαξη, χρησιμοποιήσαμε την ενισχυμένη, πολύ ευαίσθητη και πολύ ειδική μέθοδο της εμφολεάζουσας PCR.
- 6) Μερικές φορές υπάρχει ανάμειξη του φυσιολογικού με το νεοπλασματικό ιστό, ενώ άλλες του καρκινωμάτωσης ιστού με αδενωμάτωση ιστό, που αποτελεί το πρόδρομο του καρκινώματος και είναι σε άμεση επαφή με αυτό (επιδεικνύοντας συχνά ασυμφωνία ως προς το *K-ras* status¹⁹⁰) είτε που βρίσκεται σε γειτνίαση με το καρκίνωμα⁶⁷. Για το λόγο αυτό, για κάθε ιστική περιοχή που θέλαμε να εξετάσουμε χρησιμοποιούσαμε και διαφορετική λαβίδα βιοψίας από αυτή που είχαμε χρησιμοποιήσει αμέσως προηγουμένως, αλλάζοντας μάλιστα τη λαβίδα βιοψίας όταν επρόκειτο να περάσουμε από τη δειγματοληψία που προοριζόταν για ερευνητικούς σκοπούς σε αυτή που κατευθυνόταν για διαγνωστικούς σκοπούς στην ίδια ιστική περιοχή. Ακόμα, όταν επρόκειτο να εξετάσουμε κοντινές περιοχές, ξεκινούσαμε τη δειγματοληψία από την κεφαλική και καταλήγαμε στην ουραία περιοχή. Επίσης, ελέγχουμε όλες τις ιστικές περιοχές, ως προς την ιστική τους ομοιογένεια, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε και εκ των υστέρων ότι δεν είχε συμβεί ιστική ανάμειξη.
- 7) Υπάρχει ανομοιογένεια, όσον αφορά στο *K-ras* status, τόσο εντός των αδενωμάτων^{157,183} όσο και εντός των καρκινωμάτων του κόλου¹⁵⁸, με αυτή των αδενωμάτων μάλιστα να είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των καρκινωμάτων και αυτή των πρώιμων καρκινωμάτων να είναι μεγαλύτερη αυτής των προχωρημένων καρκινωμάτων^{158,183}. Η ανομοιογενής κατανομή στον καρκινωμάτωση ιστό αντιμετωπίστηκε με την biopsy on the biopsy τεχνική, με τη λήψη δηλαδή βιοψίας επί του σημείου που είχε ήδη προηγηθεί βιοψία.
- 8) Τα διαθέσιμα προς εξέταση κύτταρα περιορίζονται τόσο από τη νέκρωση που παρατηρείται πολλές φορές εντός του καρκινικού ιστού *in vivo*, όσο και από την ιστική καταστροφή που οφείλεται στο χειρισμό των δειγμάτων (για παράδειγμα κατά την κοπή του χειρουργικού υλικού). Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι γονίδια με μήκος > 45000 bp, όπως το *K-ras*, παραμένουν άθικτα σε λιγότερο από το 1/3 των κυττάρων των ιστών που υφίστανται επεξεργασία, όπως η εκτομή των ιστών κατά το χειρουργείο. Έτσι η συχνότητα της μετάλλαξης υποεκτιμάται¹⁸³. Για το λόγο αυτό, η συλλογή του υλικού γινόταν προσεκτικά, ακολουθούσε προσανατολισμός των δειγμάτων και το υλικό μεταφερόταν άμεσα στο εργαστήριο.
- 9) Στον καρκινικό ιστό υπάρχει ανάμειξη των νεοπλασματικών κυττάρων με κύτταρα στρωματικά και φλεγμονώδη. Το *K-ras* status των τελευταίων επηρεάζει το σήμα στις πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα¹⁸³, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της πραγματικής συχνότητας της μετάλλαξης. Επίσης υπάρχει περίπτωση ένας καρκίνος με φτωχή κυτταροβρίθεια (ιδίως εάν είναι <20%) να δώσει ψευδή αποτελέσματα για απουσία μετάλλαξης, ενώ αυτή είναι παρούσα⁴⁴. Για να περιορισθούν στο ελάχιστο οι παρεμβολές αυτές, χρησιμοποιούσαμε υλικό από μεγάλα ιστοτεμαχίδια, ορατά στο κέντρο των κύβων παραφίνης, τα οποία οι Παθολογοανατόμοι είχαν ελέγξει ήδη με 1-2 λεπτές τομές για την όσο το δυνατό μεγαλύτερη περιεκτικότητα του υλικού σε καρκινικά κύτταρα.

Ποια είναι η πρακτική σημασία της ανίχνευσης φυσιολογικού K-ras (wt K-ras) σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο ενός κόλου με αποκλειστικά καλοήθεις πολύποδες;

Είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται ότι ένα απόλυτα φυσιολογικό έντερο με φυσιολογικό (ενδοσκοπικά **και** ιστολογικά) βλεννογόνο, που αντιπροσωπεύει το γενικό πληθυσμό, δεν φέρει μεταλλάξεις K-ras. Στη μελέτη μας αποδείξαμε επίσης ότι ένα έντερο με σποραδικούς καλοήθεις πολύποδες χωρίς καρκίνο είναι δυνατόν να φέρει μεταλλάξεις K-ras στο φυσιολογικό (ενδοσκοπικά **και** ιστολογικά) βλεννογόνο αυτού. Επειδή η μετάλλαξη K-ras είναι *de novo* επίκτητη μετάλλαξη, είναι απόλυτα λογικό να θεωρήσουμε, ότι ένα έντερο με πολύποδες μπορεί να έχει αποκτήσει, σε δεδομένη στιγμή της ζωής του ατόμου, τη μετάλλαξη K-ras στον βλεννογόνο του. Η απόκτηση της K-ras μετάλλαξης δεν επηρεάζει την ακεραιότητα του βλεννογόνου, αλλά είναι κρίσιμη για την επαγωγή της καρκινογένεσης (κομβικό σημείο 1, πίνακας 13, γράφημα 3). Η απουσία, συνεπώς, της μετάλλαξης από το σύστημα φυσιολογικό βλεννογόνο ενός κόλου με πολύποδες δηλώνει, ότι, πιθανότατα, το έντερο αυτό δεν απέκτησε την οδηγό μετάλλαξη που θα οδηγούσε τον βλεννογόνο αυτού σε μοριακές αλλαγές, αναγκαίες για τη διαδικασία της καρκινογένεσης¹¹⁷.

Ποια, αντιθέτως, είναι η πρακτική σημασία του να βρεθεί η μετάλλαξη (mt K-ras) σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο ενός κόλου που φέρει αποκλειστικά καλοήθεις πολύποδες;

Βάσει των πορισμάτων της μελέτης μας μπορούμε να υποστηρίξουμε βάσιμα ότι οι δύο ιδιότητες της K-ras μετάλλαξης που ισχύουν στο καρκινικό κόλον (πρωιμότητα, προγνωστικός βιοδείκτης) μπορούν να ισχύουν και στο κόλον με καλοήθεις πολύποδες χωρίς καρκίνο. Φαίνεται ότι η παθογενετική σημασία της μετάλλαξης K-ras στην ορθοκολική ογκογένεση είναι η ίδια, ανεξάρτητα εάν τελικά αυτή θα καταλήξει σε καρκίνο ή όχι (πορίσματα 19, 21 και 23 κεφαλαίου 10). Όπως γίνεται σαφές στη σελίδα 110, οι δύο ομάδες (ca-free group/ca-bearing group) έχουν πολλές ομοιότητες, που καταδεικνύουν κοινή ογκογενετική συμπεριφορά, επιτρέποντάς μας να τις θεωρήσουμε ως ενιαία ομάδα : την ομάδα του κόλου με καλοήθεις πολύποδες, **polyp-bearing bowel** (πίνακας 13, γράφημα 5).

Για την **πρωιμότητα της μετάλλαξης** η παρούσα έρευνα έδωσε **ισχυρές ενδείξεις**. **Πρώτον**, το ca-bearing group δεν είχε περισσότερες K-ras μεταλλάξεις σε σχέση με το ca-free group. **Δεύτερον**, η μετάλλαξη ήταν συχνότερη στο ca-free group σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. **Τρίτον**, Ο φυσιολογικός βλεννογόνος του ca-free group είχε περισσότερες K-ras μεταλλάξεις από την ομάδα ελέγχου. **Τέταρτον**, ο φυσιολογικός βλεννογόνος μακριά από τα νεοπλάσματα είχε ίσες μεταλλάξεις με την ομάδα ελέγχου, αλλά ο φυσιολογικός βλεννογόνος εγγύς στα νεοπλάσματα περισσότερες. **Πέμπτον**, οι καλοήθεις ορθοκολικοί πολύποδες των δύο groups έφεραν τα ίδια ποσοστά K-ras μεταλλάξεων μεταξύ τους αλλά και με τους συνυπάρχοντες φυσιολογικούς τους βλεννογόνους. **Έκτον**, η μετάλλαξη K-ras δεν συμβάλλει στο σχηματισμό του πρώιμου αδενώματος (κατοχυρωμένη γνώση ήδη από πληθώρα μελετητών^{34,79,121,192}, επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας, γράφημα 1). Επομένως, **η K-ras μετάλλαξη είναι ένα πολύ πρώιμο** γενετικό γεγονός στη διαδικασία της ορθοκολικής καρκινογένεσης.

Επίσης, κατ' αναλογία με το ca-bearing group, θεωρούμε ότι η μετάλλαξη K-ras αποτελεί **πρώιμο βιοδείκτη** στο ca-free group : η ανίχνευση της οδηγού μετάλλαξης K-ras στο φυσιολογικό βλεννογόνο ενός εντέρου που φέρει πολύποδες αλλά όχι καρκίνο, είναι πιθανό να προδικάζει τη μελλοντική ανάπτυξη καρκίνου στο έντερο αυτό.

Σημαντική παρατήρηση της μελέτης αποτελεί η πανομοιότυπη μοριακή συμπεριφορά των φυσιολογικών ιστών στα δύο groups : είτε υπάρχει καρκίνος είτε όχι, είτε η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κοντά ή μακριά από το νεόπλασμα, είτε το νεόπλασμα είναι οδοντωτό είτε δυσπλαστικό, μικρό ή μεγάλο, η θετικότητα στη μετάλλαξη K-ras δεν αλλάζει : **το 15% των φυσιολογικών ιστών φέρει τη μετάλλαξη**. Όλοι οι ιστολογικά και ενδοσκοπικά φυσιολογικοί ιστοί επομένως από έντερο με πολύποδες επιδεικνύουν την ίδια ογκογόνο δυναμική, ανεξάρτητα εάν συνυπάρχει καρκίνος στο κόλον αυτό ή όχι.

Επιπρόσθετη και ιδιαίτερος χρήσιμη παρατήρηση της μελέτης είναι η αξιοσημείωτη συμφωνία, όσον αφορά στο K-ras status, μεταξύ των νεοπλασματικών και των σύστοιχων φυσιολογικών ορθοκολικών ιστών, η οποία ισχύει σε αμφότερες τις ελεγχθείσες ομάδες. Εδώ εντοπίσαμε μία ουσιώδη διαφορά ανάμεσα στα δύο groups (πόρισμα 14 κεφαλαίου 10). Στην ομάδα χωρίς καρκίνο οι δύο κατηγορίες ιστών (νεοπλασματικοί και φυσιολογικοί) δεν έχουν μόνο την ίδια συχνότητα K-ras μεταλλάξεων· υπάρχει αντιστοιχία του K-ras status των φυσιολογικών με τους νεοπλασματικούς ιστούς, μπορούμε δηλαδή να προβλέψουμε το K-ras status των μεν εάν γνωρίζουμε το K-ras status των δε. Συνεπώς, η ανίχνευση της μετάλλαξης στον καλοήγη πολύποδα έχει ακριβώς την ίδια προγνωστική αξία με την ανίχνευσή της στον φυσιολογικό ιστό. Στην ομάδα ασθενών με καρκίνο, παρά τη σημαντική συμφωνία μεταξύ καρκίνου και φυσιολογικών ιστών (γεγονός που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία ¹⁴⁵), το K-ras status στους φυσιολογικούς ορθοκολικούς ιστούς δεν μπορεί να προβλέψει το K-ras status του συνυπάρχοντος καρκίνου, γεγονός που επίσης συμφωνεί με τη βιβλιογραφία ¹²⁵ και κατέχει επίσης την κλινική του σημασία (βλέπε κεφάλαιο 13).

Συμπληρωματικά με τα πιο πάνω, αποδείχθηκε ότι και στα δύο groups, η K-ras μετάλλαξη βοηθά στη μετατροπή του μη προχωρημένου αδενώματος σε προχωρημένο και, γενικότερα, του μη προχωρημένου νεοπλάσματος σε προχωρημένο, παρατήρηση που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία ¹²¹. Το ποσοστό της μετάλλαξης στα προχωρημένα αδενώματα συμφωνεί με πολλούς ερευνητές ¹²¹, ενώ η παντελής απουσία της μετάλλαξης στα μη προχωρημένα αδενώματα αποτελεί έκπληξη. Δύναται όμως να αποδοθεί στο μικρό μέσο μέγεθός τους (πίνακας 2) και συμπλέει με το πολύ χαμηλό ποσοστό (3%) ανίχνευσης της K-ras μετάλλαξης σε σποραδικά αδενώματα μεγέθους 0,5 εκ σε σχετικά πρόσφατη εργασία ¹⁷⁴. Επίσης, επιβεβαιώσαμε άλλους ερευνητές, ότι δηλαδή η μετάλλαξη K-ras δεν συμβάλλει στην αύξηση του μεγέθους του αδενώματος ^{122,175,192}. Τέλος, το ποσοστό ανίχνευσής της μετάλλαξης στα αδενώματά μας (22,72 %) συμφωνεί με τα ποσοστά της βιβλιογραφίας (7,9-34 % για αδενώματα μικρότερα του 1 εκ, 44-59% για αδενώματα μεγαλύτερα του 1εκ ^{52,34,192}) δεδομένου και του μεσαίου μεγέθους τους (0,95 εκ)

Σε αντίθεση όμως με ότι είναι αποδεκτό από πολλούς ^{174,175,192} (αλλά όχι από όλους ¹²¹), δεν επιβεβαιώσαμε την συνεισφορά της μετάλλαξης στη μετατροπή του αδενώματος με χαμηλόβαθμη δυσπλασία στο αδένωμα με υψηλόβαθμη δυσπλασία. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στο μικρό αριθμό ιστικών περιοχών με υψηλόβαθμη δυσπλασία (n=5, πίνακας 8). Επίσης, τα αποτελέσματά μας δεν είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα της μεγάλης πλειονότητας των ερευνητών, οι οποίοι έχουν δείξει ότι η K-ras μετάλλαξη κατευθύνει τη γένεση του λαχνωτού στοιχείου εντός του αδενώματος ^{121,122,177,192}. Ομοίως, αυτή η διαφωνία πιθανόν να οφείλεται στο μικρό αριθμό περιστατικών.

Η συνεισφορά της μελέτης στη συμβολή της K-ras μετάλλαξης στην αλληλουχία της οδοντωτής καρκινογένεσης είναι χρήσιμη, αλλά όχι κριτικής σημασίας. Οι μεταλλάξεις K-ras ανιχνεύθηκαν στο 14,28 % των οδοντωτών αλλοιώσεων της μελέτης μας, ποσοστό που τοποθετείται στα κατώτερα όρια της βιβλιογραφίας ^{121,178}. Αυτό εξηγείται από το μικρό μέγεθος των οδοντωτών αδενωμάτων (0,52 εκ, πίνακας 1), ενώ σε όλα απουσίαζε η υψηλόβαθμη δυσπλασία. Έτσι όλα τα οδοντωτά αδενώματα της μελέτης περιελήφθησαν στα

μη προχωρημένα νεοπλάσματα. Η απουσία οδοντωτών καρκινωμάτων δεν μας επιτρέπει να αξιολογήσουμε της εξέλιξη της μετάλλαξης στο μονοπάτι του φαινοτύπου υπερμεθυλίωσης.

Το γεγονός ότι, παρά το σχεδόν διπλάσιο μέγεθός τους (0,95 εκ έναντι 0,52 εκ, πίνακας 1), τα κλασικά αδενώματα δεν φέρουν περισσότερες *K-ras* μεταλλάξεις από τα οδοντωτά αδενώματα, τόσο εντός κάθε group, όσο και στο σύνολο των συμμετεχόντων, δηλώνει την μεγάλη σημασία της μετάλλαξης αυτής στην ολοκλήρωση των μονοπατιών που οδηγούν στη γένεση των οδοντωτών αδενωμάτων. Δεν συνάδει με τον περιορισμένο ρόλο της *K-ras* μετάλλαξης στο μονοπάτι του φαινοτύπου υπερμεθυλίωσης, που οδηγεί σε σποραδικά ορθοκολικά νεοπλάσματα, όπως αυτός καταγράφηκε σε πρόσφατες ανασκοπήσεις^{41,42}. Η αντίφαση αυτή πιθανόν αιτιολογείται τόσο από το μικρό αριθμό οδοντωτών νεοπλασμάτων όσο και από την απουσία ικανού αριθμού όλων των υποκατηγοριών των οδοντωτών αλλοιώσεων στη μελέτη μας. Τέλος, το σημαντικό ποσοστό *K-ras* μεταλλάξεων στην κατηγορία αυτή των νεοπλασμάτων, υπονοεί ότι η μετάλλαξη αυτή μπορεί να συνεισφέρει στη νεοπλασματική δυναμική των υπερπλαστικών πολυπόδων, της πιο συχνά απαντώμενης κατηγορίας ορθοκολικών οδοντωτών αλλοιώσεων, οι οποίοι, σύμφωνα με μερίδα ερευνητών, είναι, δυνητικά, πρόδρομες αλλοιώσεις των ορθοκολικών καρκινωμάτων^{49, 193,194}.

Στα προχωρημένα στάδια της ορθοκολικής καρκινογένεσης, η έρευνά μας σε γενικές γραμμές επιβεβαίωσε τα κατοχυρωμένα από τη βιβλιογραφία δεδομένα. Δείξαμε, ότι η μετάλλαξη δεν συνεισφέρει ούτε στη μετάβαση του προχωρημένου νεοπλάσματος σε καρκίνωμα, ούτε στη μεταστατική εξαλλαγή του καρκινώματος. Επίσης αποδείχθηκε ότι παρά την εξέλιξη του ορθοκολικού καρκίνου σε όλο και πιο προχωρημένο στάδιο, το ποσοστό ανίχνευσης της μετάλλαξης δεν άλλαξε (γράφημα 2). Τα ποσοστά της μετάλλαξης στους καρκινικούς ιστούς μόλις που υπερέβαιναν τα αντίστοιχα των προχωρημένων αδενωμάτων (54,16% έναντι 50%), ενώ στις μεταστάσεις αυτά υποχωρούσαν στο 42,85%. Αυτή η κατιούσα πορεία στη συχνότητα της μετάλλαξης ενδεχομένως να εξηγείται από το ότι η *K-ras* μετάλλαξη, ως οδηγός μετάλλαξη, είναι πιθανόν να μην διατηρείται κατά την εξαλλαγή του αδενώματος, όπως υπαινίσσονται δεδομένα σε νεοπλασματικό και κυτταρικό επίπεδο, αλλά και σε επίπεδο αλληλίου¹⁸⁰. Αυτή η παρατήρηση είναι σε σύμπνοια με ερευνητικά δεδομένα από νεοπλάσματα άλλης προέλευσης που μας δείχνουν ότι οι οδηγές μεταλλάξεις προσφέρουν ελάχιστο πλεονέκτημα επιβίωσης (μόλις 0,4 %)¹⁹⁵. Αυτό το ελάχιστο πλεονέκτημα μεταφράζεται σε πολύ ψηλά ποσοστά (99%) εξαφάνισής τους κατά την πρόοδο του νεοπλάσματος¹⁹⁶. Επίσης, οι μεταστατικοί ηπατικοί ιστοί παρουσίασαν μεταλλάξεις *K-ras* σε όμοια ποσοστά με τους φυσιολογικούς ιστούς κοντά στα αντίστοιχα πρωτοπαθή καρκινώματα. Τέλος, οι μεταστατικοί ηπατικοί ιστοί επέδειξαν απόλυτη συμφωνία, όσον αφορά στο *K-ras* status, με τα πρωτοπαθή καρκινώματα (πίνακας 3), γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με άλλες εργασίες¹⁹⁷ και αιτιολογείται πιθανόν από τον μικρό αριθμό των μεταστατικών ιστών της μελέτης μας.

Σημαντικά δεδομένα είναι αυτά που αφορούν στη σχέση της μετάλλαξης *K-ras* με την ηλικία. Δείξαμε ότι η μετάλλαξη μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία, χωρίς να εξαρτάται από αυτήν : αφενός κάθε ξεχωριστή κατηγορία ιστού, φυσιολογικού και νεοπλασματικού, έχει την ίδια πιθανότητα να φέρει τη μετάλλαξη σε μικρές και μεγάλες ηλικίες (πίνακας 6), αφετέρου η ηλικία των πασχόντων από ορθοκολικό καρκίνο δεν διέφερε, είτε έφεραν είτε δεν έφεραν μετάλλαξη *K-ras* στον καρκινικό τους ιστό (πόρισμα 2 κεφαλαίου 10). Αυτά τα δεδομένα δεν συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Κάποιες εργασίες δείχνουν ότι η απόκτηση της μετάλλαξης *K-ras* εξαρτάται από το χρόνο^{122, 173} και η συχνότητά της αυξάνεται προϊούσης της ηλικίας στα ορθοκολικά αδενώματα¹⁵⁴ και καρκινώματα¹⁹⁸, ενώ άλλες δείχνουν ότι η συχνότητά της είναι μικρότερη σε άτομα της

τρίτης ηλικίας¹⁷⁵. Μεγαλύτερος αριθμός ασθενών θα δια φωτίσει το ζήτημα αυτό λεπτομερώς στο μέλλον.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι :

1. τα ποσοστά ανιχνευσιμότητας της μετάλλαξης στις αρχικές κατηγορίες των ιστικών περιοχών, όπως αυτές ορίστηκαν στη σελίδα 76 (πίνακας 12, σελίδα 107) και
2. το γεγονός ότι δεν προέκυπτε από αυτά κάποιο σαφές μοντέλο προόδου της συχνότητας της μετάλλαξης κατά την εξέλιξη των σταδίων της ορθοκολικής καρκινογένεσης από το φυσιολογικό βλεννογόνο προς τη μετάσταση (γραφήματα 1 και 2)

κατηγοριοποιήσαμε εκ νέου τους ορθοκολικούς ιστούς (πίνακας 13). Στη νέα κατηγοριοποίηση συγχωνεύσαμε τις κατηγορίες ιστών με παρόμοια ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων. Έτσι : τα μη προχωρημένα αδενώματα ετέθησαν στην ίδια κατηγορία (μη προχωρημένα νεοπλάσματα) με τα οδοντωτά αδενώματα (πόρισμα 10 κεφαλαίου 10) και τα προχωρημένα νεοπλάσματα ενοποιήθηκαν με τα πρωτοπαθή καρκινώματα (πόρισμα 22 κεφαλαίου 10). Η νέα κατηγοριοποίηση δεν διέφερε ανάμεσα στα δύο groups. Επιπλέον τα κομβικά σημεία μετάβασης ήταν χρονικά ταυτόσημα στα δύο groups (γραφήματα 3 και 4, πίνακας 13). Αυτή η ομοιογένεια καθώς και οι πολλές άλλες ομοιότητες ανάμεσα στις δύο ομάδες (σελίδα 110) μας επέτρεψαν να ομογενοποιήσουμε τις δύο ομάδες σε **μία ενιαία ομάδα με πολύποδες παχέος εντέρου με ή χωρίς καρκίνο (polyp-bearing bowel)**: στην ομάδα αυτή το μοντέλο καρκινογένεσης είναι κοινό και αναγνωρίζονται δύο κομβικά σημεία αιχμής (Κ.Σ. 1, Κ.Σ. 2), τα οποία οριοθετούν τρία επίπεδα, μεταξύ των οποίων η συχνότητα του ογκογονιδίου K-ras καταγράφει κλιμακούμενη αύξηση (πίνακας 13). Τόσο τα διακριτά επίπεδα όσο και τα κομβικά σημεία είναι ακριβώς τα ίδια στο cancer-free bowel, στο cancer-bearing bowel και στο polyp-bearing bowel (γραφήματα 3-5, πίνακας 13).

Τα επίπεδα κλιμακούμενης αύξησης της συχνότητας του K-ras είναι τα ακόλουθα :

Το **πρώτο επίπεδο**, αυτό του παχέος εντέρου και ορθού με μη μεταλλαγμένο, ιστολογικά και ενδοσκοπικά φυσιολογικό βλεννογόνο. Το επίπεδο αυτό αναπαριστά το γενικό πληθυσμό και αντιστοιχεί στο ορθό/κόλον πριν την επίδραση του ογκογονιδίου K-ras. Το K-ras βρίσκεται υπό τη μορφή του πρωτοογκογονιδίου και υπάρχει πολύ μικρή πιθανότητα να έχει ξεκινήσει η ογκογόνος διαδικασία.

Το **δεύτερο επίπεδο**, αυτό του παχέος εντέρου και ορθού με βλεννογόνο μεταλλαγμένο ως προς το K-ras, αλλά ιστολογικά και ενδοσκοπικά φυσιολογικό, σε συνδυασμό με καλοήγη μη προχωρημένα νεοπλάσματα, αντιστοιχεί στο ορθό/κόλον μετά την επίδραση του ογκογονιδίου K-ras. Το K-ras βρίσκεται υπό τη μορφή του ογκογονιδίου, η ογκογόνος διαδικασία συμβαίνει στους πολύποδες και είναι ήδη σε εξέλιξη-προώθηση (promotion), ή είναι σε φάση εκκίνησης στον φυσιολογικό ιστό (initiation).

Το **τρίτο επίπεδο**, αυτό του παχέος εντέρου και ορθού που φέρει προχωρημένο νεόπλασμα, καρκινικό ή όχι, με ή χωρίς μεταστάσεις, αντιστοιχεί στο ορθό/κόλον μετά την επίδραση του ογκογονιδίου K-ras και την προσθήκη άλλων γενετικών τροποποιήσεων. Το K-ras βρίσκεται υπό τη μορφή του ογκογονιδίου και η ογκογόνος διαδικασία είναι ήδη σε πρόοδο (progression).

Μολονότι η μετάλλαξη K-ras είναι ισχυρό ογκογονίδιο^{115, 198} και αποτελεί τη συχνότερη γενετική αλλοίωση¹¹⁶ και την επικρατούσα ογκογόνο οδηγό μετάλλαξη στον ορθοκολικό καρκίνο⁸⁶, από μόνη της δεν αρκεί να προκαλέσει καρκίνο⁸⁰. Απαιτείται συσσώρευση επιπλέον μεταλλάξεων, με τις οποίες η μετάλλαξη K-ras συνεργάζεται για την επιτάχυνση της διαδικασίας. Αυτή η σύμπραξη έχει αποδειχθεί για τα ενδιάμεσα και τα όψιμα στάδια της ορθοκολικής καρκινογένεσης (όπως πχ κατά τη μετάπτωση του μη προχωρημένου νεοπλάσματος σε προχωρημένο νεόπλασμα), στα οποία η συνέργεια της μετάλλαξης K-ras με άλλα ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι τεκμηριωμένη^{30,31,34,40,80,120,195}. Αυτό που δεν έχει διασαφηνισθεί είναι το μοντέλο της συνεργασίας ανάμεσα στις αρχέγονες γενετικές αλλοιώσεις σε πρώιμα και πολύ πρώιμα στάδια της ορθοκολικής καρκινογένεσης.

Δοθέντων ότι :

- 1^{ον} το APC απενεργοποιείται πρώιμα στον ορθοκολικό καρκίνο^{39,63} ,
- 2^{ον} το μονοπάτι Wnt/APC/β-κατενίνη ενεργοποιείται σχεδόν καθολικά στα ανθρώπινα ορθοκολικά καρκινώματα^{61,63} ,
- 3^{ον} η K-ras μετάλλαξη εμφανίζεται πολύ πρώιμα στην πορεία της ορθοκολικής ογκογένεσης,
- 4^{ον} τα μονοπάτια Wnt και MAPK^{76,199} αλληλεπιδρούν και αλληλεξαρτώνται στενά (βλέπε κεφάλαιο 8 γενικού μέρους) και
- 5^{ον} Η μετάλλαξη του APC δεν είναι απαραίτητη για την έναρξη της ορθοκολικής καρκινογένεσης⁶³ (βλέπε κεφάλαιο 7 γενικού μέρους),

θεωρούμε ότι η μηχανιστική βάση της εκκίνησης της πορείας της ορθοκολικής καρκινογένεσης στα πρώιμα και πολύ πρώιμα στάδιά της (initiation) είναι η αμοιβαία εξάρτηση, επίδραση, αξιοποίηση και ενίσχυση των μονοπατιών Wnt και MAPK, με αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση των ογκογόνων ιδιοτήτων τους.

Αυτό σημαίνει ότι η μετάλλαξη K-ras είναι απολύτως αναγκαία, προκειμένου το ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC να καταστεί «ικανό» να εκπληρώσει το ρόλο του, την επαγωγή δηλαδή της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και του ορθού. Επομένως, ανοίγεται ένα **παράθυρο αμφισβήτησης** της απόλυτης παντοδυναμίας του μεταλλαγμένου APC (ή γενικότερα της ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/APC /β-κατενίνη) στην εκκίνηση της ορθοκολικής καρκινογένεσης.

13. Το προτεινόμενο πρότυπο σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης : το θεωρητικό γονιδιακό δίπολο

Σε αυτό το παράθυρο αμφισβήτησης βασίζουμε το **πρότυπο που προτείνουμε** (εικόνα 22) για υποομάδα περιπτώσεων σποραδικού ορθοκολικού καρκίνου και γενικότερα για μερίδα περιπτώσεων σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης. Στο πρότυπο αυτό, θεωρούμε ότι η πρωταρχική γενετική αλλοίωση συμβαίνει πολύ πρώιμα σε φυσιολογικό ιστολογικά βλεννογόνο και αφορά στην σωματική (επίκτητη) μετάλλαξη ενός αλληλίου του πρωτοογκογονιδίου *K-ras*, εξαιτίας της επίδρασης κάποιου περιβαλλοντικού μιτογόνου. Το μεταλλαγμένο *K-ras* δεν δρα ογκογενετικά, όσο το δεύτερο αλληλόμορφο του παραμένει φυσιολογικό, διότι το φυσιολογικό αλληλίο (πρωτοογκογονίδιο) καταστέλλει το μεταλλαγμένο (ογκογονίδιο)^{99,109}. Όταν και τα δύο αλληλία μεταλλαχθούν, προάγεται διάχυτη υπερπλασία των επιθηλιακών κολονικών κυττάρων, χωρίς να αλλάζει ο αριθμός των αρχέγονων κυττάρων στην κρύπτη⁸⁴.

Η κύρια θέση που δρα το ομόζυγα μεταλλαγμένο *K-ras* είναι η μεταβατική ζώνη (sweet spot) της κρύπτης (εικόνα 8) : επάγει τον πολλαπλασιασμό των t-a cells (που βρίσκονται στο άνω τμήμα της εσοχής⁵⁵) και επεκτείνει την ζώνη των προγονικών κυττάρων (crypt domain, εικόνα 6)⁸⁵ και τη μεταβατική ζώνη προς το άνω τμήμα της κρύπτης (εικόνα 8)⁵³. Το μεταλλαγμένο *K-ras* επιτυγχάνει τις δράσεις αυτές, επειδή το υπερπλαστικό επιθήλιο δεν επιτρέπει στα προγονικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν⁸⁵, επάγοντας ένα πρόγραμμα αποδιαφοροποίησης παρόμοιο με αυτό των εμβρυϊκών προγονικών κυττάρων⁸⁶.

Τελικά η μετάλλαξη *K-ras* προσφέρει ένα εκλεκτικό πλεονέκτημα στο προγονικό ή το ωριμάζον κύτταρο, τα οποία πολλαπλασιάζονται ασύμμετρα και οι απόγονοί τους αρχικά καταλαμβάνουν την εσοχή της κρύπτης (μονοκλωνική μετατροπή της εσοχής)⁵⁵ και ακολούθως ολόκληρη την κρύπτη, κατευθυνόμενα προς τον αυλό (μονοκλωνική μετατροπή της κρύπτης)⁵⁴. Ακολουθεί η διαίρεση της κρύπτης, κατά την οποία η αλλοίωση παραμένει μονοκλωνική⁵⁵. Η μετάδοση των κυττάρων με τη μετάλλαξη στις γειτνιάζουσες κρύπτες (καρκινοποίηση του πεδίου) οδηγεί αρχικά σε ανώμαλες κρύπτες και, στη συνέχεια σε εστίες ανωμάτων κρυπτών (aberrant crypt foci=ACF), οι οποίες είναι μονοκλωνικές^{55, 63}. Αρχικά αυτές είναι υπερπλαστικές, μη οδοντωτές⁵⁰. Στην πορεία μετατρέπονται είτε σε δυσπλαστικές (μικροαδενώματα), οι οποίες είναι οι πρόδρομες αλλοιώσεις των κλασικών αδενωμάτων, είτε σε οδοντωτές υπερπλαστικές, οι οποίες είναι οι πρόδρομες αλλοιώσεις των οδοντωτών αλλοιώσεων^{50,63}. Τα μικροαδενώματα φέρουν τη μετάλλαξη *K-ras* σε σημαντικά ποσοστά (63%)⁶³, ενώ οι υπερπλαστικές οδοντωτές και μη οδοντωτές ανώμαλες κρυπτικές εστίες σε μικρότερα ποσοστά (19% και 42 % αντίστοιχα)⁵⁰.

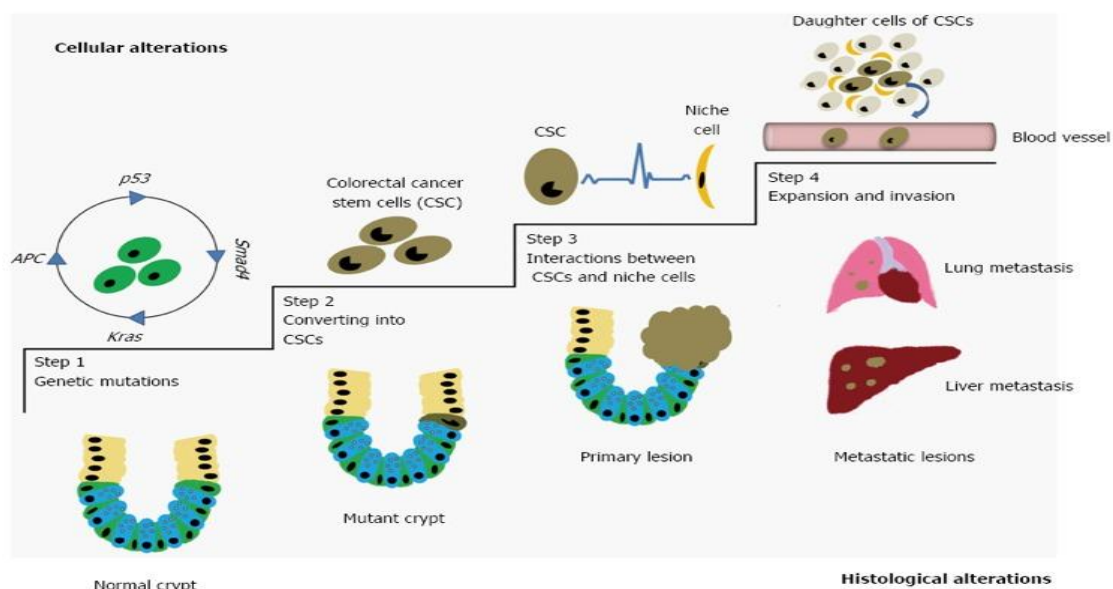
Παράλληλα με τη μετανάστευση των πρόδρομων και την υπερπλασία των ώριμων κολονικών κυττάρων, το ογκογονίδιο *K-ras* προκαλεί σημαντικού βαθμού γενωμική αστάθεια στα stem cells, στα t-a cells και στα διαφοροποιημένα κολονικά κύτταρα. Αυτό το επιτυγχάνει επειδή επάγει γονιδιακή αστάθεια (βλάβη DNA, απάντηση στη βλάβη του DNA (DDR), παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου), ιστική φλεγμονή και όλα τα ιδιαίτερα γνωρίσματα του καρκίνου (βλέπε κεφάλαιο 10 γενικού μέρους). Τελικά, ενεργοποιεί το μονοπάτι Wnt, κυρίως μέσω απενεργοποίησης του APC. Αυτό οδηγεί σε ομοιόμορφη αύξηση των σημάτων Wnt σε όλο το μήκος της υπό σχηματισμό παθολογικής (δυσπλαστικής ή υπερπλαστικής) κρύπτης⁵³. Επομένως η μετάλλαξη *K-ras* είναι η κινητήριος δύναμη της ογκογένεσης, το πολύ πρώιμο εφελτήριο της όλης διαδικασίας, το μοριακό γεγονός που, δυνητικά, θέτει την ογκογόνο διαδικασία σε «λειτουργία». **Χρονικά συμβαίνει πριν την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt**, προκειμένου το τελευταίο να μεγιστοποιήσει τις δικές

του δράσεις. Ουσιαστικά, η μετάλλαξη K-ras είναι η **μοριακή «σκανδάλη»** που πυροδοτεί το μονοπάτι Wnt.

Παρά την πρώιμή της εμφάνιση, η K-ras μετάλλαξη είναι αυτοπεριοριζόμενη^{95,99,109,120,141}. Τελικά, ο κίνδυνος για έναρξη της ογκογένεσης είναι μεν υπαρκτός, αλλά η επιτάχυνση της πορείας προϋποθέτει επιπρόσθετες γενετικές αλλαγές σε ογκογονίδια ή/και σε ts-genes. Εάν αυτές δεν συμβούν, η K-ras μετάλλαξη αυτοκαταργείται ή οδηγεί σε αλλοιώσεις με μικρό κακόηθες δυναμικό, όπως οι υπερπλαστικοί πολύποδες⁵⁰ (εικόνα 5, δεξιά στήλη). Για παράδειγμα, στην περίπτωση που το μονοπάτι Wnt δεν ενεργοποιηθεί, τα μικροαδενώματα δεν εξελίσσονται σε αδενώματα, αντιθέτως αυτοκαταργούνται⁶³. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει, λόγω της γήρανσης που επάγεται από το mt K-ras^{63, 141}, η οποία αναστέλλεται, όταν το APC είναι μεταλλαγμένο ή απενεργοποιημένο⁸⁵.

Πράγματι, το μονοπάτι των MAP κινασών έχει απόλυτη ανάγκη αυτή την επανενίσχυση για να επιτύχει στον ογκογενετικό του ρόλο και να προκαλέσει τα προαναφερθέντα πρόδρομα γεγονότα (niche succession, crypt fission, field cancerization). Η υπερενεργοποίηση Wnt έχει 2 επιπτώσεις : 1^ο, μετατρέπει τις ACF σε πρώιμα αδενώματα και 2^ο, ισχυροποιεί ακόμη περισσότερο το μονοπάτι Ras/Raf/MAPK (ο οποίος βρίσκεται ήδη κλειδωμένος στην κατάσταση RAS-GTP). Λόγω της επίδρασης αυτής, το μονοπάτι των MAP κινασών υπερακοντίζει τις δράσεις του.

Επιτυγχάνοντας την αμοιβαία ενεργοποίησή τους, αποδεικνύεται ότι τα δύο κυρίαρχα μονοπάτια της ορθοκολικής ογκογένεσης χρειάζονται και «εκμεταλλεύεται» το ένα το άλλο για να πετύχει το καθένα τους οντογενετικούς του στόχους. Δρουν μεν παράλληλα (εικόνα 21), αλλά ουσιαστικά αλληλοενισχύονται. Όπως φαίνεται στις εικόνες 21 και 22, με τη στενή συνέργειά τους οι δύο μεταλλάξεις σχηματίζουν ένα **θεωρητικό γονιδιακό δίπολο** : **όποιο μέλος του διπόλου συμβεί πρώτο, αναπόφευκτα ενεργοποιεί και το άλλο μέλος, το οποίο δρα συμπληρωματικά, επάγοντας διάδοχους κύκλους αμοιβαίας ενίσχυσης** (εικόνα 20).



Εικόνα 20 : Η κυκλική ανατροφοδότηση, η αμοιβαία αλληλεξάρτηση και η διαδοχική ενεργοποίηση μεταξύ των μεταλλάξεων K-ras και APC αποτελεί πολύ πρώιμο μοριακό γεγονός, που συμβαίνει στα βλαστικά κύτταρα της φυσιολογικής κολονικής κρύπτης και συμβάλλει στη μετατροπή της σε παθολογική κολονική κρύπτη · όχημα για τη μετατροπή αυτή αποτελεί η μεταμόρφωση των φυσιολογικών ορθοκολικών προγονικών κυττάρων σε καρκινικά ορθοκολικά προγονικά κύτταρα (από αναφορά 56).

Αποτέλεσμα των διαδοχικών κύκλων αμοιβαίας ανατροφοδότησης μεταξύ των δύο μονοπατιών, είναι η σχηματοποίηση και η εγκατάσταση του γονιδιακού διπόλου. Το δίπολο δρα από κοινού στα πρώιμα στάδια της ορθοκολικής ογκογένεσης : η μεν *K-ras* μετάλλαξη είναι το αρχικό γεγονός, συμβάλλοντας στη μετατροπή της φυσιολογικής κρύπτης σε ACF, η δε *APC* μετάλλαξη είναι το μεταγενέστερο γεγονός και είναι κριτικής σημασίας για τη μετατροπή του ACF σε πρώιμο αδένωμα (εικόνα 22). Ουσιαστικά, όμως, επειδή τα δύο μονοπάτια αλληλοεξαρτώνται, αλληλοενισχύονται και το ένα δρα μέσω του άλλου (εικόνα 21), **το δίπολο [mt *K-ras* ή *MAPK*] ---- [mt *APC* ή *Wnt*]** είναι αυτό που συλλογικά είναι «υπεύθυνο» για την μετατροπή του φυσιολογικού βλεννογόνου σε πρώιμο αδένωμα.

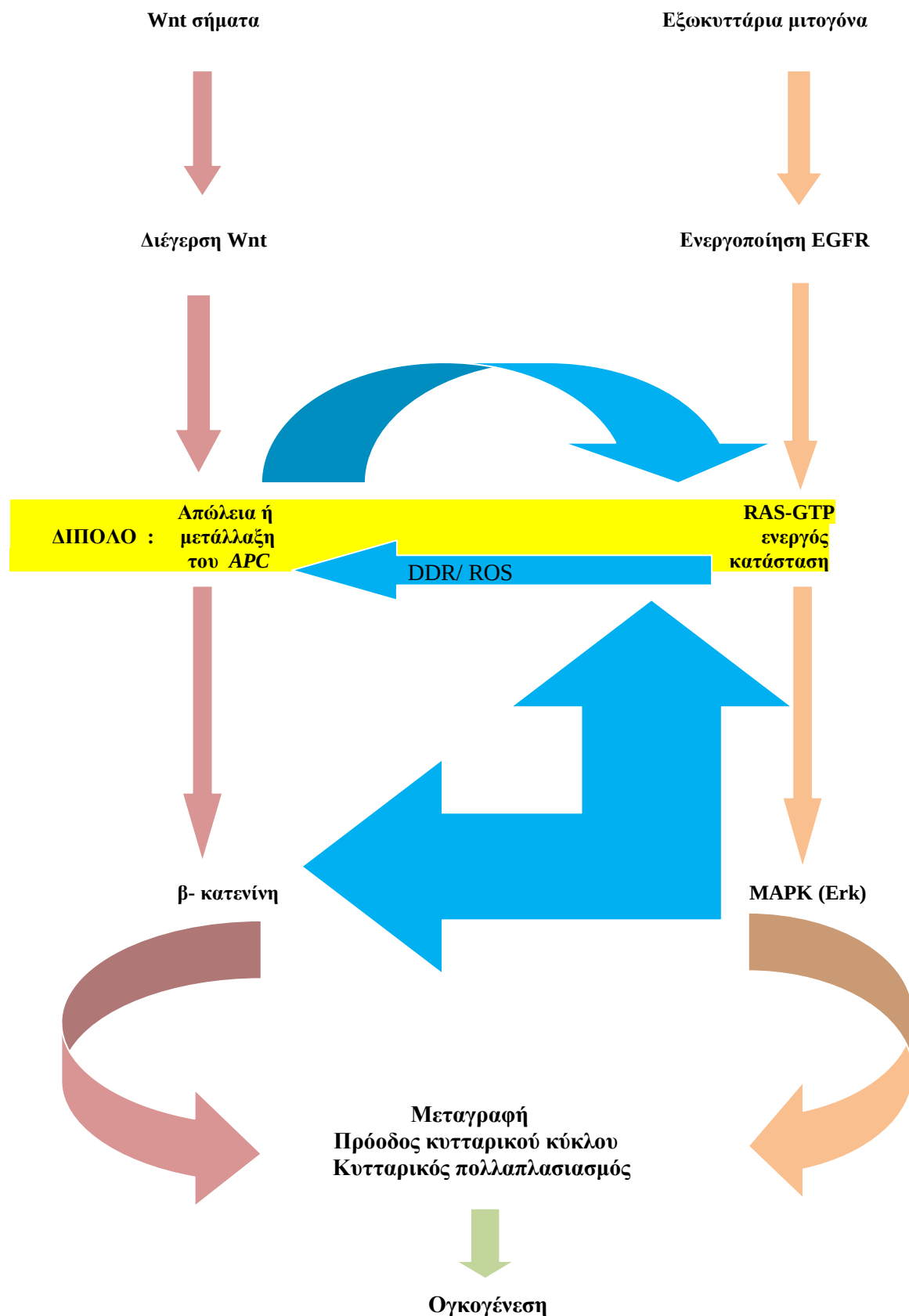
Έτσι η μετάλλαξη *K-ras* είναι ταυτόχρονα το αρχικό γεγονός της ογκογενετικής διαδικασίας, το γεγονός που θέτει τα θεμέλια του διπόλου και αυτό τελικά που βοηθά στην εγκατάστασή του. Με το μηχανισμό αυτό, η μετάλλαξη *K-ras* εκκινεί την όλη διαδικασία. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με πρόσφατες ανασκοπήσεις^{63,80}.

Ακόμα και στην περίπτωση που η μονοαλληλική απώλεια/απενεργοποίηση του *APC* (και όχι το mt *K-ras*) είναι το αρχικό γεγονός, δεν είναι αυτό καθεαυτό το πρωταρχικό γεγονός που εκκινεί τη διαδικασία. Μάλλον βοηθά τα προγονικά κύτταρα να μεταναστεύουν προς τη λαχνωτή περιοχή των κρυπτών, δίνοντας την ευκαιρία στο *K-ras* να προκαλέσει την απώλεια της ετεροζυγωτίας στο *APC*⁵⁴. Επομένως, **και στην περίπτωση που η mt *APC* προηγείται χρονικά, η μετάλλαξη *K-ras* είναι αυτή που σχηματοποιεί και εγκαθιστά το δίπολο και αποτελεί το πραγματικό γεγονός που εκκινεί την ογκογόνο διαδικασία.** Συνεπώς, σε όλες τις περιπτώσεις ορθοκολικής ογκογένεσης, το δίπολο παριστά την πύλη εισόδου, μέσα από την οποία το φυσιολογικό επιθήλιο μεταμορφώνεται σε αδένωμα.

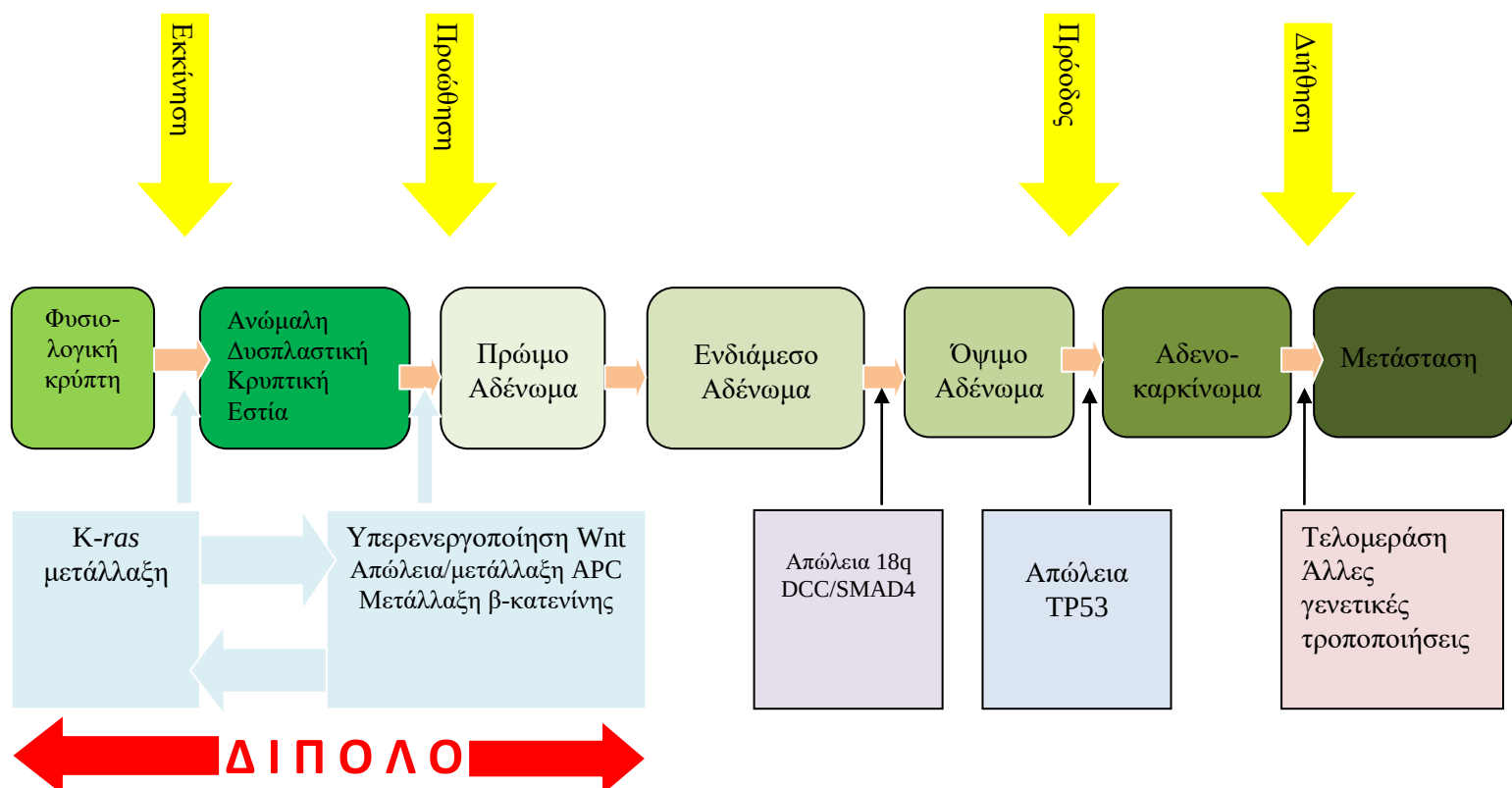
Γενικά, το πρότυπο που προτείνουμε δεν αμφισβητεί τον πρωτεύοντα ρόλο του μονοπατιού *Wnt* στη διαδικασία της ορθοκολικής καρκινογένεσης, θέτει όμως εν αμφιβόλω την απόλυτη κυριαρχία της μετάλλαξης/απενεργοποίησης του *APC*, στην εκκίνηση της διαδικασίας ογκογένεσης. Είναι ουσιαστικά μία παραλλαγή του τρέχοντος μοντέλου, η οποία πιθανότατα ισχύει σε υποομάδα ορθοκολικής καρκινογένεσης.

Το προτεινόμενο πρότυπο έχει σημαντικά πλεονεκτήματα : **1^{ον}** εξηγεί εν μέρει το υψηλό ποσοστό των *K-ras* μεταλλάξεων που παρατηρούνται στις δυσπλαστικές ACF συγκριτικά με τα ορθοκολικά καρκινώματα^{63,64} **2^{ον}** ερμηνεύει την εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία που παρουσιάζει η *K-ras* μετάλλαξη εντός των αδενωμάτων^{34,52,177,180,192} **3^{ον}** θέτει σε σωστή βάση τη συνεισφορά της *K-ras* μετάλλαξης στην καρκινογένεση στο γονότυπο 2, όπου συνήθως απουσιάζει η *APC* μετάλλαξη, αλλά ενδέχεται να υπάρχει η μετάλλαξη στο *K-ras*⁴¹ **4^{ον}** δίνει μία λογικοφανή εξήγηση για τις περιπτώσεις που η χρωμοσωμική αστάθεια προηγείται της *APC* απενεργοποίησης⁶³ και **5^{ον}** δίνει απάντηση στο ερώτημα των χαμηλών ποσοστών (20-63%) της απώλειας της ετεροζυγωτίας *APC* που παρατηρείται στα σποραδικά αδενώματα και καρκινώματα^{77,78}.

Τελικά, στις περιπτώσεις της εκκίνησης της ορθοκολικής ογκογένεσης όπου το μοντέλο αυτό θα αποδεικνυόταν αληθινό, δεν θα ήταν υπερβολή να υποστηριχθεί ότι η μετάλλαξη *K-ras* είναι πράγματι, αναγκαία για την επαγωγή και την επιτάχυνση της καρκινογένεσης, πιθανότατα δε και επαρκής, εφόσον, ακόμα και όταν δεν προκύψει απενεργοποίηση/απώλεια του *APC* ή άλλη ισοδύναμη γενετική αλλοίωση στο μονοπάτι *Wnt* (υπό την επίδραση ποικίλων μιτογόνων), η μετάλλαξη *K-ras* είναι ικανή, μέσω της βλάβης στο DNA και της μείωσης της επαρκούς επιδιόρθωσης που προκαλεί (εικόνα 16), να οδηγήσει σε απενεργοποίηση του *APC* (εικόνες 20-22). Συνεπώς, **η κοινώς αποδεκτή πεποίθηση ότι το ογκογονίδιο *K-ras* δεν είναι ούτε ικανή ούτε αναγκαία συνθήκη για την έναρξη και προώθηση της ορθοκολικής καρκινογένεσης δύναται να τεθεί εν αμφιβόλω, τουλάχιστον για υποπεριπτώσεις σποραδικής ορθοκολικής καρκινογένεσης.**



Εικόνα 21: Σχηματικό διάγραμμα της ροής και της αλληλεπίδρασης της πληροφορίας διά μέσου των δύο κύριων μονοπατιών εκκίνησης και προώθησης της ανθρώπινης ορθοκολικής καρκινογένεσης (Wnt and MAPK). Το διάγραμμα απεικονίζει την αλληλοενίσχυση και την αλληλεξάρτησή τους, καθώς και το γονιδιακό δίπολο (κίτρινη σκίαση), το οποίο προτείνεται ότι έχουν συστήσει τα δύο κύρια γονίδια των μονοπατιών, το K-ras και το APC.



Εικόνα 22: Το εναλλακτικό πρότυπο, το οποίο προτείνεται για υποκατηγορία των σποραδικών ορθοκολικών καρκινωμάτων, μία παραλλαγή της ισχύουσας αλληλουχίας αδενώματος-καρκινώματος σε μοριακό επίπεδο : η μετάλλαξη K-ras, η αρχική μετάλλαξη στον καταρράκτη Ras/Raf/MAPK, λαμβάνει χώρα πολύ νωρίς στη διαδικασία της ορθοκολικής καρκινογένεσης, βοηθώντας στο σχηματισμό μικροαδενώματος (δηλαδή της δυσπλαστικής ανώμαλης κρυπτικής εστίας), συνεισφέροντας στην έναρξη της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και το ορθό. Παράλληλα, επάγοντας την απάντηση στη βλάβη του DNA (DNA damage response - DDR) και τη γένεση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και άλλων μεσολαβητών, η μετάλλαξη K-ras υπερενεργοποιεί το μονοπάτι Wnt, κυρίως μέσω της απενεργοποίησης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC. Με τον τρόπο αυτό, η μετάλλαξη K-ras είναι η μοριακή σκανδάλη, η κατευθυντήριος και κινητήριος δύναμη, που ενισχύει κατακόρυφα (πολλαπλασιάζει) τις επιδράσεις του μονοπατιού Wnt. Το μονοπάτι Wnt έχει απόλυτη ανάγκη τη μετάλλαξη K-ras για να «λειτουργήσει» ογκογενετικά. Μία από τις δράσεις του Wnt είναι η επανενίσχυση του μονοπατιού της MAPK (το οποίο είναι κλειδωμένο στην κατάσταση RAS-GTP), επομένως, η μεγιστοποίηση των δράσεων του καταρράκτη Ras/Raf/MAPK. Το μονοπάτι της MAPK χρειάζεται την προερχόμενη από το μονοπάτι Wnt εκτόξευση για να ολοκληρώσει επιτυχώς τις ενέργειές του. Αυτό σημαίνει ότι η ανώμαλη δυσπλαστική κρύπτη δεν θα εξελισσόταν σε πρώιμο αδένωμα (θα αυτοκαταργείτο), εάν το APC παρέμενε φυσιολογικό. Επιτυγχάνοντας τα 2 μονοπάτια την αμοιβαία ενεργοποίησή τους, το κάθε ένα χρειάζεται και χρησιμοποιεί το άλλο για να εκπληρώσει τον ογκογενετικό του ρόλο : συνιστούν ένα **θεωρητικό γονιδιακό δίπολο**. Η μετάλλαξη στο K-ras αποτελεί το γεγονός εκκίνησης, το εναρκτήριο λάκτισμα της πορείας καρκινογένεσης, το προαπαιτούμενο για την απώλεια ή απενεργοποίηση του APC (η οποία παραμένει και στο παρόν μοντέλο η κυρίαρχη γενετική αλλοίωση, η απολύτως αναγκαία για τη δημιουργία και εγκατάσταση του διπόλου). Ακόμα και στην περίπτωση που η μονοαλληλική απώλεια/απενεργοποίηση του APC είναι η αρχική γενετική αλλοίωση, δεν συνιστά, εν τούτοις, το σημείο εκκίνησης της ογκογόνου διαδικασίας · μάλλον βοηθά τα βλαστικά κύτταρα να μεταναστεύσουν στη λαχνωτή περιοχή, η οποία είναι η κύρια τοποθεσία της κολονικής κρύπτης όπου δρα το μεταλλαγμένο K-ras, δίνοντας με τον τρόπο αυτό την ευκαιρία στο K-ras να προκαλέσει την απώλεια της ετεροζυγωτίας του APC, και, μέσω της προαναφερθείσας αλληλεπίδρασης και αλληλεξάρτησης, να εκκινήσει την καρκινογένεση (βασισμένο στις αναφορές : 36, 39, 53-56, 61,63, 64, 80, 82-84, 87, 115, 120-123).

14.Γιατί η ανίχνευση *K-ras* μεταλλάξεων στον μη καρκινικό ιστό του παχέος εντέρου και του ορθού είναι κλινικά σημαντική ;

Το τμήμα του γενικού πληθυσμού, στο οποίο έχουν διαγνωσθεί και εξαιρεθεί ενδοσκοπικά καλοήθεις ορθοκολικοί πολύποδες, υφίσταται επιτήρηση με συχνές κολονοσκοπήσεις επανελέγχου (follow-up colonoscopies). Σκοπός των κολονοσκοπήσεων αυτών είναι η έγκαιρη ανίχνευση και η ολική αφαίρεση όλων των καλοήθων πολυπόδων, οι οποίοι πιθανόν να αναπτυχθούν εκ νέου στο ίδιο έντερο. Η λογική της στρατηγικής αυτής είναι ότι, εφόσον κάθε αδένωμα, οδοντωτό ή κλασικό, έχει τη δυνατότητα να εξαλλαχθεί σε καρκίνωμα,^{37,122} και σχεδόν όλοι οι σποραδικοί ορθοκολικοί καρκίνοι προκύπτουν από την εξαλλαγή προϋπαρχόντων αδενωμάτων^{39,41,48,51,52}, η όσο το δυνατόν πρωιμότερη αφαίρεσή του αδενώματος, πριν αυτό εξαλλαγεί σε καρκίνωμα, σχεδόν μηδενίζει την πιθανότητα μελλοντικής ανάπτυξης καρκινώματος. Αυτή η στρατηγική, εν τούτοις, οδηγεί σε αχρείαστες κολονοσκοπήσεις. Τα περισσότερα αδενώματα δεν εξαλλάσσονται σε καρκίνο¹²², εφόσον το ποσοστό κακοήθους εξαλλαγής αυτών υπολογίζεται σε λιγότερο από 5%⁸⁶. Εξάλλου, παρατηρείται μεγάλη απόκλιση στο γενικό πληθυσμό μεταξύ της επίπτωσης των καλοήθων πολυπόδων (περίπου 40%)⁵² και αυτής του ορθοκολικού καρκίνου (περίπου 6%)¹⁶.

Προσπαθώντας να βρούμε έναν πρακτικό τρόπο να περιορίσουμε τις κολονοσκοπήσεις σε αυτές που όντως είναι αναγκαίες, προτείνουμε τον έλεγχο των καλοήθων πολυπόδων που αφαιρούνται ή που υπόκεινται σε βιοπτικό έλεγχο για ανίχνευση πιθανής μετάλλαξης στο ογκογονίδιο *K-ras* : η παρουσία της δηλώνει ότι η καρκινογένεση είναι σε εκκίνηση, σε προώθηση ή σε πρόοδο (βλέπε 2^ο και 3^ο επίπεδο, σελίδα 120). Οποιοδήποτε ενδεχόμενο και αν είναι πραγματικό, η *K-ras* μετάλλαξη αποκαλύπτει ότι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία βρίσκεται σε εξέλιξη και ότι αυτός ο πολύποδας φέρει αυξημένο κίνδυνο για εξαλλαγή σε καρκίνο. Εάν ο πολύποδας έχει εξαιρεθεί ενδοσκοπικά πλήρως, είναι προφανές ότι η συγκεκριμένη μη αντιστρεπτή διαδικασία διεκόπη οριστικά στο συγκεκριμένο σημείο του κόλου.

Όπως δείξαμε στη μελέτη μας : 1^η η μετάλλαξη *K-ras* στο φυσιολογικό βλεννογόνο εντέρου με πολύποδες χωρίς καρκίνο είναι ένας προγνωστικός βιοδείκτης για την μελλοντική ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου στο ίδιο έντερο και, 2^η υπάρχει αντιστοιχία στις μεταλλάξεις *K-ras* μεταξύ φυσιολογικού και νεοπλασματικού βλεννογόνου στο έντερο αυτό. Συμπεραίνουμε επομένως ότι η *K-ras* μετάλλαξη στον καλοήγη ορθοκολικό πολύποδα που έχει εξαιρεθεί πλήρως είναι κατ' αναλογία αξιόπιστος πρώιμος προγνωστικός βιοδείκτης για δυνητική μελλοντική ανάπτυξη καρκίνου στο ίδιο κόλον, και, είναι, ως εκ τούτου δόκιμο να χαρακτηριστεί ως κριτήριο, βάσει του οποίου θα επιλεγεί ο πληθυσμός για συχνή επιτήρηση με κολονοσκόπηση.

Δυστυχώς, είναι μερικές φορές δύσκολο ή ακόμα και αδύνατο να συλλεγεί πολυποειδικός ιστός για μοριακή μελέτη, λόγω των εγγενών μειονεκτημάτων και περιορισμών της διαδικασίας της κολονοσκόπησης²⁰⁰. Είναι, για παράδειγμα, δύσκολο να αποσταλεί ιστός από πολύ μικρούς πολύποδες για μοριακή ανάλυση, είτε επειδή το ελάχιστο υλικό που αποκτάται μόλις που επαρκεί για ιστολογική εξέταση, είτε επειδή οι μικροί πολύποδες δεν είναι ορατοί σε ένα έντερο με πλημμελή προετοιμασία (καλύπτονται από εντερικό περιεχόμενο). Επιπλέον, υπάρχουν πολύποδες με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (επίπεδοι, μικροί, «βυθισμένοι» κάτω από το επίπεδο του βλεννογόνου), οι οποίοι δεν μπορούν να ανιχνευθούν ή/και να προσεγγισθούν με τη λαβίδα βιοψίας ή το βρόχο πολυπεκτομής, όταν βρίσκονται επί ή όπισθεν κολονικής πτυχής.

Υπάρχουν ακόμη πολύποδες επίπεδοι ή «βυθισμένοι» στο βλεννογόνο ή ελάχιστα ανυψωμένοι προς τον αυλό ή επεκτεινόμενοι πλάγια (laterally-spreading tumors), οι οποίοι είναι ενδοσκοπικά ορατοί μόνο όταν χρησιμοποιούνται προχωρημένες ενδοσκοπικές τεχνικές, όπως η μεγεθυντική ενδοσκόπηση με περιορισμένο εύρος συχνοτήτων φωτός (Narrow-Band-Imaging Magnifying Endoscopy, NBI-ME), η χρωμοσκόπηση, η κολονοσκόπηση με καλύπτρα (cap-assisted colonoscopy) και η κολονοσκόπηση με το τρίτο μάτι ανάστροφης όρασης (third-eye retroscope) ²⁰⁰. Αυτές οι τεχνικές και τα αντίστοιχα ενδοσκοπία, ωστόσο, δεν είναι διαθέσιμα στις περισσότερες Ενδοσκοπικές Μονάδες.

Τα ποσοστά ανίχνευσης των αδενωμάτων στην κολονοσκόπηση (adenoma detection rate) ποικίλλουν από 7 % έως 44%, ανάλογα με την εμπειρία του ενδοσκόπου ²⁰⁰. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι 5-32% των πολυπόδων «χάνονται» κατά την κολονοσκόπηση : το πόσοι πολύποδες «χάνονται» κάθε φορά εξαρτάται από τη μορφή του πολύποδα (έμμισχος, άμισχος, επίπεδος), από την ποιότητα προετοιμασίας του εντέρου, από την πιστότητα ανάλυσης του φακού του κολονοσκοπίου και από τις δεξιότητες του χειριστή ²⁰¹. Σε τέτοιες περιπτώσεις, μία προκαρκινική βλάβη, πιθανόν φέρουσα K-ras μετάλλαξη, παραμένει άθικτη μετά από μία κολονοσκόπηση, στην οποία «όλοι οι πολύποδες αφαιρέθηκαν πλήρως». Τέλος, αλλά εξίσου σημαντικό, πολύ μεγάλοι πολύποδες ενός εντέρου που έχει υποστεί συστροφή είναι πιθανό να βρίσκονται πέρα από το πεδίο που είναι εφικτό να ελέγξει η κολονοσκόπηση. Οποιαδήποτε και εάν είναι η ακριβής αιτία αποτυχίας αναγνώρισης-ανίχνευσής τους, υπάρχει πιθανότητα οι πολύποδες να παροραθούν κατά τη διάρκεια μιας κολονοσκόπησης.

Σε άλλες περιπτώσεις, πολύποδας που απεκόπη με βρόχο πολυπεκτομής μπορεί να καταστεί μη ορατός, λόγω κάλυψής του με εντερικό περιεχόμενο μετά την αφαίρεση, και να παραμείνει στο έντερο, παρά τις προσπάθειες εντοπισμού του στο έντερο ή στη συσκευή αναρρόφησης. Σπάνια, οι πολύποδες εντοπίζονται σε στενή γειτνίαση ή σε άμεση επαφή με στόμια εκκολπωμάτων. Η συνθήκη αυτή αποθαρρύνει τους ενδοσκόπους να προβούν σε αφαίρεση ή ακόμα και σε βιοψτικό έλεγχο των πολυπόδων, επειδή ο κίνδυνος αιμορραγίας είναι μεγάλος. Επίσης οι ενδοσκόποι είναι «υποχρεωμένοι» να μην βιοψήσουν πολύποδες, τα ενδοσκοπικά χαρακτηριστικά των οποίων παραπέμπουν σε κίνδυνο αιμορραγίας ή που βρίσκονται σε ένα έντερο που αιμορραγεί ενεργά.

Στην πράξη, ο στόχος της **ολικής** ανίχνευσης και της **ολικής** αφαίρεσης **όλων** των καλοήθων ορθοκολικών πολυπόδων σε **όλες** τις κολονοσκοπήσεις παραμένει, παρά την πρόοδο της ιατρικής τεχνολογίας, ουτοπικός. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις μη ανίχνευσης/μη αφαίρεσης των πολυπόδων, η ανίχνευση της K-ras μετάλλαξης στο φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο από ένα μη καρκινικό έντερο που φέρει, βάσει των ενδοσκοπικών κριτηρίων, καλοήθεις πολύποδες, είναι δηλωτική της μελλοντικής ανάπτυξης καρκίνου στο έντερο αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος πρώιμος προγνωστικός βιοδείκτης. Προτείνεται, επομένως, βάσει των ανωτέρω, σε όλους τους ενδοσκόπους που ανακαλύπτουν καλοήθεις πολύποδες σε κολονοσκόπηση να προβαίνουν, εκτός από την αφαίρεσή τους, στην παράλληλη μοριακή ανάλυση ιστικών δειγμάτων από τους πολύποδες αυτούς ή από τους σύστοιχους φυσιολογικούς ορθοκολικούς ιστούς για πιθανές μεταλλάξεις του ογκογονιδίου K-ras.

Όλα τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη K-ras αρχικά προτείνεται να ελέγχονται με κολονοσκόπιο λευκού φωτός υψηλής ευκρίνειας. Εάν στην αρχική αυτή ενδοσκόπηση δεν βρεθούν ύποπτες αλλοιώσεις, προτείνεται να ακολουθούν συμβατική ενδοσκοπική επιτήρηση σε συχνά χρονικά μεσοδιαστήματα. Στην περίπτωση που ενδοσκοπικά προκύψουν ενδείξεις για κακοήγη ή για προκακοήγη αλλοίωση, ως επόμενο βήμα προτείνεται μία από τις προαναφερθείσες προχωρημένες ενδοσκοπικές τεχνικές, όπως η NBI-ME. Επίσης θα μπορούσαν στο μέλλον να υποβληθούν σε περαιτέρω ορθοκολικές βιοψίες, στοχευμένες ή

όχι, προκειμένου να ανιχνευθούν ενδεχόμενες μεταλλάξεις σε άλλα κρίσιμα για την ογκογένεση γονίδια, κυρίως του έτερου πόλου (*APC*) του θεωρητικού γονδιακού διπόλου αλλά και του *TP53*, εφόσον βέβαια μία τέτοια πρακτική αποδεικνυόταν χρήσιμη κλινικά. Σε περίπτωση που υπάρχει εμπειρία στην κοινότητα, μπορεί να προσφερθεί στους ασθενείς μία καινούργια τεχνική, η probe-based confocal laser endomicroscopy (p-CLE), μία μέθοδος *in vivo* ιστολογίας, η οποία χαρτογραφεί το βλεννογόνο και διακρίνει, βάσει προτύπων, το φυσιολογικό από τον νεοπλασματικό βλεννογόνο. Εξίσου σημαντικό είναι να τροποποιηθεί ο τρόπος ζωής των ατόμων αυτών προκειμένου να αποτραπεί η επίδραση των πιθανών περιβαλλοντικών μιτογόνων στο βλεννογόνο που ήδη έχει υποστεί μία ισχυρή ογκογόνο μετάλλαξη (αποφυγή καπνίσματος, ζάχαρης, λίπους, κόκκινου επεξεργασμένου κρέατος, αύξηση κατανάλωσης φυτικών ινών, ψαριού, φρούτων, λαχανικών, γάλακτος, αύξηση φυσικής δραστηριότητας, απώλεια βάρους)¹²⁰.

Αναμφίβολα, δεν θα πρέπει να υποτιμηθούν οι επιπτώσεις στην ψυχική σφαίρα που ενδεχομένως επιφέρει σε ένα υγιές άτομο η γνώση ότι φέρει μία ογκογόνο μετάλλαξη¹⁵⁷. Ο κλινικός ιατρός οφείλει να εξηγήσει στον φέροντα τη μετάλλαξη του πρωτοογκογονιδίου *K-ras* ότι δεν οδηγείται νομοτελειακά στον καρκίνο · αντιθέτως, με τα σωστά προληπτικά μέτρα και με τακτική ορθής επιτήρησης, ο καρκίνος θα προληφθεί. Επίσης θα πρέπει να εξηγηθεί στον φέροντα την *K-ras* μετάλλαξη στον ορθοκολικό του βλεννογόνο ή πολύποδα, ότι η μετάλλαξη αυτή αποκτήθηκε στη διάρκεια της ζωής του, λόγω επίδρασης διατροφικών και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων, ότι δεν είναι κληρονομική, και, ως εκ τούτου, δεν μεταφέρεται στους απογόνους του.

Αντιθέτως, όσοι δεν φέρουν μετάλλαξη *K-ras* στους ορθοκολικούς πολύποδες ή στον φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο αυτών, προτείνεται να ακολουθήσουν εναλλακτική στρατηγική, εφόσον αποδείξαμε, όπως και άλλοι¹³⁷, ότι η απουσία της μετάλλαξη *K-ras* στον ορθοκολικό βλεννογόνο δηλώνει ότι η διαδικασία καρκινογένεσης δεν έχει πιθανότατα ξεκινήσει ακόμα. Παρόλα αυτά, η παρακολούθηση και τα ειδικά προληπτικά μέτρα συνιστώνται στα άτομα αυτά ομοίως. Ο λόγος είναι ότι, ακόμα και εάν το μοντέλο που προτείνουμε επιβεβαιωθεί, η μετάλλαξη *K-ras* δεν είναι αναγκαία για την εκκίνηση πολλών περιπτώσεων ορθοκολικής ογκογένεσης^{120,191}. Ως εκ τούτου, τα άτομα αυτά δεν έχουν κανένα λόγο να εφησυχάζουν. Η επιτήρησή τους, όσον αφορά στους ορθοκολικούς πολύποδες, θα συνεχίζει να υφίσταται. Θα είναι μεν λιγότερο αυστηρή, αλλά προτείνεται να είναι εξατομικευμένη, ανάλογα και με τους παράγοντες κινδύνου του κάθε ατόμου ξεχωριστά.

15.Περιορισμοί της μελέτης.

Κατευθυντήριες στρατηγικές μελλοντικής έρευνας.

Η μελέτη μας έχει αρκετούς **περιορισμούς**. Τα ιστικά δείγματα, αν και πολλά και μεγάλα, δεν έφθασαν σε τέτοιο αριθμό που να καθιστούν τα πορίσματα της μελέτης πολύ ισχυρά. Επιπλέον ο αριθμός τόσο των ασθενών όσο και της ομάδας ελέγχου δεν ήταν μεγάλος. Μελετήθηκαν αποκλειστικά οι μεταλλάξεις στα κωδικόνιο 12 και 13 των εξωνίου 2 του *K-ras* και όχι άλλες σημειακές μεταλλάξεις του πρωτοογκογονιδίου *K-ras*. Το μέσο μέγεθος των καλοήθων πολυπόδων, κλασικών και οδοντωτών, ήταν μικρό. Δεν υπήρχαν δείγματα από όλες τις υποκατηγορίες των οδοντωτών αδενωμάτων, ενώ δεν υπήρχαν οδοντωτά καρκινώματα στη μελέτη. Επίσης δεν ανευρέθηκαν προχωρημένα οδοντωτά αδενώματα. Συνεπώς, τα συμπεράσματά μας, αν και περιλαμβάνουν κλασικά και οδοντωτά αδενώματα, έχουν προσανατολισθεί περισσότερο στα κλασικά. Ο αριθμός των καλοήθων πολυπόδων στο cancer-bearing group ήταν μικρός. Επίσης ο αριθμός των δειγμάτων από μεταστατικές εστίες ήταν μικρός, ενώ οι δευτεροπαθείς εστίες ήταν αποκλειστικά ηπατικής προέλευσης. Στη μελέτη μας δεν είχαμε ούτε μία περίπτωση ασθενή με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου A κατά Dukes. Υπήρχε, τέλος, πολύ μικρός αριθμός ασθενών, στους οποίους είχαμε διαθέσιμους ιστούς από την πλειονότητα των ενδιάμεσων σταδίων της διαδικασίας της ορθοκολικής καρκινογένεσης.

Η **μελλοντική έρευνα** έχει τη δυνατότητα να στοχεύσει σε πολλά πεδία, αναφορικά με το ρόλο του ογκογονιδίου *K-ras* στην εκκίνηση, την προώθηση και την πρόοδο της ορθοκολικής καρκινογένεσης, καθώς και για την αξία του ως προγνωστικού βιοδείκτη. Η παρούσα έρευνα ανέδειξε τάσεις, τα πορίσματά της χρήζουν επιβεβαίωσης. Για το λόγο αυτό, η διερεύνηση είναι δόκιμο να πορευθεί στο μέλλον προς κατευθύνσεις όπως :

1. Η επιστράτευση μεγάλου αριθμού ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο, πολλών ατόμων με πολύποδες κόλου και πολλών υγιών εθελοντών.
2. Η ανεύρεση ατόμων με καλοήθεις ορθοκολικούς πολύποδες με ή χωρίς ορθοκολικό καρκίνο, στους οποίους να υπάρχουν ταυτόχρονα πολλά ή όλα τα ενδιάμεσα στάδια της καρκινογένεσης.
3. Η διερεύνηση της αξίας της *K-ras* μετάλλαξης στην αλληλουχία οδοντωτής καρκινογένεσης.
4. Η διερεύνηση της αξίας της *K-ras* μετάλλαξης σε καλοήθεις πολύποδες μεγάλου (>1 εκ) και πολύ μεγάλου (> 2 εκ) μεγέθους.
5. Ο έλεγχος των μεταλλάξεων του *K-ras* πέρα από τα συνηθισμένα (12 και 13 του εξωνίου 2) και σε άλλα κωδικόνια του εξωνίου 2 του *K-ras* (πχ κωδικόνιο 61).
6. Ο έλεγχος για πιθανές μεταλλάξεις του *N-ras* σε κάθε ιστική περιοχή που εξετάζεται.
7. Η έρευνα στο ρόλο του *K-ras* στον καρκινικό ιστό να επεκταθεί σε ασθενείς όλων των σταδίων κατά Dukes.
8. Ο καθορισμός του τι είναι ενδοσκοπικά φυσιολογικό είναι εφικτό και δόκιμο να περνά μέσα από τη χρήση προχωρημένων ενδοσκοπίων και τεχνικών. Έτσι, ο έλεγχος για μεταλλάξεις *K-ras* μπορεί να γίνει στοχευμένα, τόσο από απόλυτα φυσιολογικές περιοχές όσο και από περιοχές με υποψία προνεοπλασματικών βλαβών που αναδεικνύονται δύσκολα με γυμνό μάτι.
9. Η μετάλλαξη *K-ras* είναι σημειακή μετάλλαξη. Έχει αξία να μελετάται κάθε φορά το είδος της νουκλεοτιδικής αντικατάστασης στο *K-ras*

πρωτοογκογονίδιο , χρησιμοποιώντας την Next Generation Sequencing ¹⁸² , προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν οι K-*ras* μεταλλάξεις είναι ίδιες ή διαφορετικές μεταξύ διαφορετικών ιστικών περιοχών του ίδιου κόλου.

10. Μελλοντικά θα μπορούσε να γίνει χαρτογράφηση της συχνότητας της μετάλλαξης K-*ras* στους φυσιολογικούς ιστούς εντέρων με πολύποδες και/ή καρκίνο, σε κλιμακούμενη απόσταση από τα νεοπλάσματα.
11. Επειδή το K-*ras* δρα σε πρώιμα και πολύ πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και του ορθού, θεωρούμε λογικό, σε ανάλογη μελλοντική μελέτη, να μελετηθούν ταυτόχρονα με το K-*ras* και άλλα γονίδια, κυρίως το APC, προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος των μεταλλάξεων των δύο γονιδίων στην εκκίνηση της καρκινογένεσης, η σημασία του προτεινόμενου διπόλου στα αρχικά και πολύ αρχικά στάδια της νόσου καθώς και η πιθανή συνέργεια του ογκογονιδίου K-*ras* με άλλα γονίδια απαραίτητα στην ορθοκολική καρκινογένεση.
12. Είναι γνωστό ότι η έκφραση του 60% περίπου των γονιδίων ρυθμίζεται από μόρια RNA μικρού μήκους, 18-25 νουκλεοτιδίων, τα microRNAs και ότι η διαδικασία ογκογένεσης σε πολλούς καρκίνους ρυθμίζεται από την επίδραση των microRNAs σε γνωστά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια ^{22,23} . Σε διάφορους καρκίνους, στους οποίους ανήκει και ο ορθοκολικός, το πρωτοογκογονίδιο K-*ras* ρυθμίζεται από πολλά microRNAs, μεταξύ των οποίων κυρίαρχο είναι το let-7. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι μερικές από τις ισομορφές της οικογένειας let-7 συμπεριφέρονται ογκοκατασταλτικά, εφόσον τα επίπεδά τους βρέθηκαν μειωμένα σε καρκινικό ιστό όταν αυτά συγκρίνονται με παρακείμενο ή απομακρυσμένο φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο. Το let-7 δρα ογκοκατασταλτικά, αναστέλλοντας τη μεταγραφή του K-*ras* μέσω της σύνδεσής του με το 3' αμετάφραστο άκρο του mRNA του K-*ras*. Τελεολογικά, η φυσική επιλογή σπάνια χρησιμοποιεί δύο μηχανισμούς που στοχεύουν στην ίδια διαδικασία, προκειμένου να επιτευχθεί ένα βιολογικό ή μοριακό αποτέλεσμα ή να προκληθεί μία νόσος. Θα είχε αξία, επομένως, η μελλοντική έρευνα να καταγράψει τα επίπεδα του let-7 σε ορθοκολικό καρκίνο, σε καλοήθεις πολύποδες και σε φυσιολογικό ορθοκολικό βλεννογόνο πλησίον και σε απόσταση από πολύποδες και καρκίνο. Επίσης θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η όποια συνεισφορά των μειωμένων επιπέδων του let-7 στα πρώιμα στάδια της ογκογένεσης. Τέλος, αξίζει να εξετασθεί η χρήση των χαμηλών επιπέδων του let-7 ως υποψήφιου βιοδείκτη, δηλωτικού άρσης της ογκοκαταστολής ^{79, 112, 113} .
13. Επειδή η καταγραφή του K-*ras* status σε διαδοχικά στάδια της ογκογένεσης σε έναν ασθενή σε δεδομένη χρονική στιγμή είναι μία στατική μελέτη, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί η εξέλιξη στο χρόνο του K-*ras* status φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών ενός συγκεκριμένου εντέρου με πολύποδες και η αναγνώριση της αξίας του K-*ras* ως πρώιμου βιοδείκτη με πραγματικούς όρους (δηλαδή *εάν όντως* οι φέροντες τη μετάλλαξη K-*ras* στο ορθό/παχύ έντερο αναπτύσσουν περισσότερους ορθοκολικούς καρκίνους στο χρόνο συγκριτικά με αυτούς στο κόλον των οποίων δεν ανιχνεύεται μετάλλαξη K-*ras*).

16. Συμπεράσματα

1. Το φυσιολογικό κόλον ατόμου χωρίς κληρονομικό ιστορικό ορθοκολικού καρκίνου δεν φέρει *K-ras* μεταλλάξεις.
2. Σε απουσία κληρονομικότητας ορθοκολικού καρκίνου, ο φυσιολογικός βλεννογόνος παχέος εντέρου/ορθού, με καλοήθεις πολύποδες αποκλειστικά, είναι δυνατόν να φέρει *K-ras* μεταλλάξεις.
3. Ο φυσιολογικός βλεννογόνος του κόλου με καλοήθεις πολύποδες έχει την ίδια πιθανότητα (15%) με το φυσιολογικό βλεννογόνο του καρκινικού κόλου να φέρει την *K-ras* μετάλλαξη, επιδεικνύοντας παρόμοια ογκογενετική ικανότητα.
4. Οι καλοήθεις ορθοκολικοί πολύποδες έχουν την ίδια πιθανότητα με τον συνυπάρχοντα ορθοκολικό βλεννογόνο να φέρουν την *K-ras* μετάλλαξη, ανεξάρτητα εάν το κόλον φέρει καρκίνο ή όχι.
5. Το *K-ras* status ενός καλοήθους ορθοκολικού πολύποδα μπορεί να προβλεφθεί με σχετική ασφάλεια από το *K-ras* status του σύστοιχου φυσιολογικού ορθοκολικού βλεννογόνου.
6. Το *K-ras* status ενός ορθοκολικού καρκίνου δεν μπορεί να προβλεφθεί από το *K-ras* status του συνυπάρχοντος φυσιολογικού ορθοκολικού βλεννογόνου.
7. Στη διαδικασία ορθοκολικής ογκογένεσης, η *K-ras* μετάλλαξη αποκτάται πολύ πρώιμα, πιθανότατα πριν τη μετάλλαξη *APC*.
8. Η ανίχνευση *K-ras* μετάλλαξης στο φυσιολογικό βλεννογόνο ή στους καλοήθεις πολύποδες του μη καρκινικού κόλου αποτελεί πιθανόν πρώιμο προγνωστικό βιοδείκτη, χρήσιμο κλινικά για την εκτίμηση μελλοντικής ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου.
9. Η *K-ras* μετάλλαξη πιθανότατα συμβάλλει στην πρόληψη του ορθοκολικού καρκίνου : τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη στον καλοήθη πολυποειδικό ιστό ή στο σύστοιχο ορθοκολικό βλεννογόνο προτείνεται να τίθενται σε εντατικότερο προληπτικό ενδοσκοπικό έλεγχο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Εργαστηριακά πρωτόκολλα

	x1 (μL)	Mastermix : x6 (μL)	
WFI	19,9	119,4	
5X (Buffer)	6,0	36,0	Επιπλέον
dNTPs (25mM)	0,24	1,44	προσθέτουμε
Mg Cl2 (50 mM)	1,2	7,2	0,5 μL
Primer Fw	1,0	6,0	DNA
Primer Rv	1,0	6,0	ανά
Rec Polymerase			eppendorf
5 U/μL	0,2	1,2	
Σύνολο	29,54	177,24	

Πρωτόκολλο 1 : Πρωτόκολλο ιντερφερόνης γ. Χρησιμοποιούσαμε 25 mM για κάθε dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP). Σε κάθε συνεδρία ελέγχουμε 4 διαφορετικά δείγματα, έναν θετικό και έναν αρνητικό μάρτυρα. Σε κάθε eppendorf (με εξαίρεση τον αρνητικό μάρτυρα) προσθέταμε 0,5 μL από το υδατικό διάλυμα DNA, που είχαμε αποθηκεύσει στους -20° C, αφού πρώτα το είχαμε αποψύξει. Στο διάλυμα που προέκυπτε, το υπό έλεγχο DNA πολλαπλασιαζόταν ενζυμικά με την ανασυνδυασμένη πολυμεράση (recombinant polymerase, INVITROGEN), με το απαραίτητο για τη δράση της χλωριούχο μαγνήσιο και με δομικά μόρια τα 4 διδεοξυνουκλεοτίδια. Σε περίπτωση που το DNA ήταν ακέραιο, το γονίδιο της ιντερφερόνης, παρόν σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα, αντιγράφεται με την επίδραση των ειδικών primers (Fw, Rv). Παρασκευάζαμε 80 ml πηκτής αгарόζης με 1,6 gr αгарόζης, 72 ml νερό, 8 ml TBE x5 και βρωμιούχο αιθίδιο για να φθορίσει όταν ακτινοβοληθεί με υπεριώδες φως [η συγκέντρωση της πηκτής ήταν υψηλή (% w/v=2%), στη συγκέντρωση αυτή οι πόροι είναι μικροί και επιτυγχάνεται καλή ανάλυση για τεμάχια DNA έως 2 kb]. Ηλεκτροφορούσαμε τα προς εξέταση δείγματα, αφού φορτώναμε 5 μL σε κάθε πηγαδάκι έναρξης. Η διαφορά τάσης ήταν 90-100 V. Τα αρνητικά φορτισμένα βιομόρια (DNA) κινούνταν προς την άνοδο (+). Τεκμήριο ότι τα προς εξέταση DNA διαλύματα δεν ήταν κατακερματισμένα αποτελούσε το γεγονός ότι κατά την οπτικοποίηση στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας το γονίδιο της ιντερφερόνης παρουσίαζε παρόμοιο μοριακό βάρος με το θετικό μάρτυρα. Η απουσία σήματος στον αρνητικό μάρτυρα δήλωνε ότι η όλη διαδικασία δεν είχε επιμολυνθεί με εξωγενές γενετικό υλικό.

	x1(μL)	Mastermix : x7(μL)	
WFI	32,9	230,3	
5X (Buffer)	10,0	70,0	Επιπλέον
dNTPs (25mM)	0,4	2,8	προσθέτουμε
Mg Cl2 (25 mM)	3,0	21,0	0,5 μL
Primer Ras A 10p/λ	1,5	10,5	DNA
Primer Ras B 10p/λ	1,5	10,5	ανά
Go Taq polymerase 5 U/μL	0,2	1,4	eppendorf
Σύνολο	49,5	346,5	

Πρωτόκολλο 2 : Πρωτόκολλο RAS A/B. Χρησιμοποιούσαμε 25 mM για κάθε dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP). Σε κάθε συνεδρία ελέγχουμε 4 διαφορετικά δείγματα, δύο θετικούς μάρτυρες (από έναν για κάθε μετάλλαξη -κωδικόνιο 12 και κωδικόνιο 13) και έναν αρνητικό μάρτυρα. Σε κάθε eppendorf (με εξαίρεση τον αρνητικό μάρτυρα) προσθέτουμε 0,5 μL από το υδατικό διάλυμα DNA που είχαμε αποθηκεύσει στους -20° C, αφού πρώτα το είχαμε αποψύξει. Το DNA-στόχος που περιείχετο στο διάλυμα πολλαπλασιαζόταν ενζυματικά με τη θερμοάντοχη Taq πολυμεράση, με το απαραίτητο για τη δράση της χλωριούχο μαγνήσιο και με δομικά μόρια τα 4 διδεοξυνουκλεοτίδια.

	x1(μL)	Mastermix : x7(μL)	
WFI	32,5	227,5	Επιπλέον
5X (Buffer)	10,0	70,0	προσθέτουμε
dNTPs (25mM)	0,4	2,8	0,5 μL
Mg Cl2 (25 mM)	3,0	21,0	PCR A/B
Primer Ras A	1,7	11,9	product
Primer Ras C	1,7	11,9	ανά
Go Taq polymerase 5 U/μL	0,2	1,4	eppendorf
Σύνολο	49,5	346,5	

Πρωτόκολλο 3 : Πρωτόκολλο RAS A/C. Χρησιμοποιούσαμε 25 mM για κάθε dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP). Σε κάθε συνεδρία ελέγχουμε 4 διαφορετικά PCR products, δύο θετικούς μάρτυρες (από έναν για κάθε μετάλλαξη -κωδικόνιο 12 και κωδικόνιο 13) και έναν αρνητικό μάρτυρα. Σε κάθε eppendorf (με εξαίρεση τον αρνητικό μάρτυρα) προσθέτουμε 0,5 μL από το υδατικό διάλυμα των PCR products της πρώτης αντίδρασης (PCR A/B). Το PCR amplicon που περιείχετο στο διάλυμα πολλαπλασιαζόταν ενζυματικά με τη θερμοάντοχη Taq πολυμεράση, με το απαραίτητο για τη δράση της χλωριούχο μαγνήσιο και με δομικά μόρια τα 4 διδεοξυνουκλεοτίδια.

	x1(μL)	Mastermix : X7 (μL)	
WFI	11,0	77,0	Επιπλέον
Buffer 3 (10X)	2,0	14,0	προσθέτουμε
Enzyme <i>BstX I</i>	2,0	14,0	5 μL
			PCR A/C
			product
Σύνολο	15,0	105,0	ανά eppendorf

Πρωτόκολλο 4 : Πρωτόκολλο RFLPs για ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του ογκογονιδίου *K-ras*. Χρησιμοποιούσαμε ως υπόστρωμα το προϊόν της δεύτερης αντίδρασης (PCR amplicon). Σε κάθε συνεδρία ελέγχουμε 4 διαφορετικά PCR products, ένα θετικό μάρτυρα (διάλυμα DNA, το οποίο έφερε γνωστή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του *K-ras*), ένα άκοπο-άπεπτο PCR amplicon - προϊόν της RAS A/C PCR (επιλέγαμε τυχαία ένα από τα τέσσερα PCR amplicons της RAS A/C PCR, στο οποίο δεν προσθέταμε *BstX-I*) και έναν MB-ladder (κατάλληλος μάρτυρας με τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους, για να έχουμε διαθέσιμο μέτρο σύγκρισης για το μέγεθος των θραυσμάτων). Σε κάθε eppendorf προσθέταμε 5 μL από το υδατικό διάλυμα των PCR products της δεύτερης αντίδρασης. Τα eppendorfs παρέμεναν κατά τη διάρκεια όλης της νύκτας στους 37° C, με σκοπό τη βέλτιστη δράση του ενζύμου περιορισμού και τα αποτελέσματα της πέψης ήταν ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου- διακρίνει μεταξύ τους μικρά μόρια DNA- και οπτικοποίηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Επί παρουσίας μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12, το *BstX-I* πέπτει το κωδικόνιο 12 αποκλειστικά σε ειδικό πολυμορφικό σημείο, 18 bp από το 3' άκρο του εξωνίου 2. Αντιθέτως, όταν η μετάλλαξη απουσιάζει (wt12), το *BstX-I* πέπτει το κωδικόνιο 12 σε δύο πολυμορφικά σημεία, το μεν 18 bp από το 3' άκρο και το δε 28 bp από το 5' άκρο του εξωνίου 2 (διαγνωστική εικόνα 2) ²⁰². Σε περίπτωση mt12, το μήκος του εξωνίου μετά την πέψη με το *BstX-I* είναι μεγαλύτερο (έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος) και, λόγω τριβής, μετακινείται δυσκολότερα στην πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου ¹⁶⁸. Συνεπώς, η ζώνη που παρουσιάζεται στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας είναι κοντύτερα προς τα σημεία φόρτωσης (πηγαδάκια) των δειγμάτων (διαγνωστική εικόνα 2). Επίσης η ζώνη του είναι πιο κοντά, αλλά σε λίγο μεγαλύτερη απόσταση από τη ζώνη που αντιστοιχεί στο άκοπο-άπεπτο PCR amplicon δείγμα, ακριβώς επειδή έχει αποκοπεί ένα μικρό τμήμα του εξωνίου.

Τελικά, η διάγνωση ότι το συγκεκριμένο δείγμα έφερε τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του *K-ras* ετίθετο από τη διπλή ζώνη πέψης στην πηκτή πολυακρυλαμίδης : η ζώνη εγγύτερα στο σημείο φόρτωσης αντιστοιχούσε στα κύτταρα με τη μετάλλαξη (mt12), ενώ η ζώνη σε μεγαλύτερη απόσταση από το σημείο φόρτωσης αντιστοιχούσε στα κύτταρα χωρίς τη μετάλλαξη (wt12) (διαγνωστικές εικόνες 2, 3 και 4) ²⁰².

	x1(μL)	Mastermix : X7 (μL)	
WFI	12,0	84,0	Επιπλέον
Buffer 2 (10X)	2,0	14,0	προσθέτουμε
Enzyme <i>Xcm-1</i>	1,0	7,0	5 μL
			PCR A/C
			product
Σύνολο	15,0	105,0	ανά eppendorf

Πρωτόκολλο 5 : Πρωτόκολλο RFLPs για ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 13 του εξωνίου 2 του ογκογονιδίου *K-ras*. Χρησιμοποιούσαμε ως υπόστρωμα το προϊόν της δεύτερης αντίδρασης (PCR amplicon). Σε κάθε συνεδρία ελέγχουμε 4 διαφορετικά PCR products, ένα θετικό μάρτυρα (διάλυμα DNA, το οποίο έφερε γνωστή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 του εξωνίου 2 του *K-ras*), ένα άκοπο-άπεπτο PCR amplicon - προϊόν της RAS A/C PCR (επιλέγαμε τυχαία ένα από τα τέσσερα PCR amplicons της RAS A/C PCR, στο οποίο δεν προσθέταμε *Xcm-1*) και έναν MB-ladder (κατάλληλος μάρτυρας με τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους, για να έχουμε διαθέσιμο μέτρο σύγκρισης για το μέγεθος των θραυσμάτων). Σε κάθε eppendorf προσθέταμε 5 μL από το υδατικό διάλυμα των PCR products της δεύτερης αντίδρασης. Τα eppendorfs παρέμεναν κατά τη διάρκεια όλης της νύκτας στους 37° C, με σκοπό τη βέλτιστη δράση του ενζύμου περιορισμού και τα αποτελέσματα της πέψης ήταν ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου- διακρίνει μεταξύ τους μικρά μόρια DNA- και οπτικοποίηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Επί παρουσίας μετάλλαξης στο κωδικόνιο 13, το *Xcm-1* πέπτει το κωδικόνιο 13 αποκλειστικά σε ειδικό πολυμορφικό σημείο, 18 bp από το 3' άκρο του εξωνίου 2. Αντιθέτως, όταν η μετάλλαξη απουσιάζει (wt13), το *Xcm-1* πέπτει το κωδικόνιο 13 σε δύο πολυμορφικά σημεία, το μεν 18 bp από το 3' άκρο και το δε 28 bp από το 5' άκρο του εξωνίου 2 (διαγνωστική εικόνα 2) ²⁰². Σε περίπτωση mt13, το μήκος του εξωνίου μετά την πέψη με το *Xcm-1* είναι μεγαλύτερο (έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος) και, λόγω τριβής, μετακινείται δυσκολότερα στην πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου ¹⁶⁸. Συνεπώς, η ζώνη που παρουσιάζεται στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας είναι κοντύτερα προς τα σημεία φόρτωσης (πηγαδάκια) των δειγμάτων (διαγνωστική εικόνα 2). Επίσης η ζώνη του είναι πιο κοντά, αλλά σε λίγο μεγαλύτερη απόσταση από τη ζώνη που αντιστοιχεί στο άκοπο-άπεπτο PCR amplicon δείγμα, ακριβώς επειδή έχει αποκοπεί ένα μικρό τμήμα του εξωνίου.

Τελικά, η διάγνωση ότι το συγκεκριμένο δείγμα έφερε τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 του εξωνίου 2 του *K-ras* ετίθετο από τη διπλή ζώνη πέψης στην πηκτή πολυακρυλαμίδης : η ζώνη εγγύτερα στο σημείο φόρτωσης αντιστοιχούσε στα κύτταρα με τη μετάλλαξη (mt13), ενώ η ζώνη σε μεγαλύτερη απόσταση από το σημείο φόρτωσης αντιστοιχούσε στα κύτταρα χωρίς τη μετάλλαξη (wt13) (διαγνωστικές εικόνες 2 και 4) ²⁰².

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet - Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65 (2): 87-108, 2015.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136 (5): E359-86 2015. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F : Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2016 Jan 27. Doi: 10.1136 /gutjnl-2015-310912.
4. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R and Jemal A: Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66 (4): 271-289, 2016.
5. Watson AJ and Collins PD: Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis* 29 (2): 222-228, 2011.
6. Martinez-Useros J and Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med* 14:21, pp 1-12, 2016. Doi: 10.1186/s12967-016-0772-5.
7. Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR and Liu K: Colorectal cancer mortality and factors related to the insulin resistance syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 385–391, 2002.
8. Bruce WR, Giacca A and Medline A: Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (12):1271-1279, 2000.
9. Rafiemanesh H, Mohammadian - Hafshejani A, Ghoncheh M, Sepehri Z, Shamlou R, Salehiniya H, Towhidi F and Makhsosi BR: Incidence and Mortality of Colorectal Cancer and Relationships with the Human Development Index across the World. *Asian Pac J Cancer Prev* 17 (5):2465-2473, 2016.
10. Will JC, Galuska DA, Vinicor F and Calle EE: Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am J Epidemiol* 147 (9):816-825, 1998.
11. Sun L and Yu S: Diabetes mellitus is an independent risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 57 (6):1586-1897, 2012.
12. Guraya SY: Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol* 21 (19): 6026-6031, 2015.
13. Beaulieu N, Bloom R and Stein R: Breakway: the global burden of cancer – challenges and opportunities. *The Economist Intelligence Chart*, 2009.
14. Vano YA, Rodrigues MJ and Schneider SM: Epidemiological link between eating habits and cancer: the example of colorectal cancer (in French). *Bull Cancer* 96: 647–658, 2009.
15. Center MM, Jemal A and Ward E: International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 1688–1694, 2009.
16. Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66 (1): 7-30, 2016.
17. <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Cancer.aspx?Cancer=10>.
18. Human Development Report 2015. Work for Human Development. New York: United Nations Development Programme (UNDP), 2015.

19. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008: *Int J Cancer* 127 (12): 2893-2917, 2010.
20. Migliore L, Migheli F, Spisni R and Coppedè F: Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:792362. doi: 10.1155/2011/792362. Epub 2011 Feb 14.
21. The Cancer Genome Atlas Network : Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-337, 2012.
22. Schmit SL, Gollub J, Shaper MH, Huang SC, Rennert HS, Finn A, Rennert G and Gruber SB: MicroRNA polymorphisms and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24 (1): 65-72, 2015.
23. Slaby O, Svoboda M, Michalek J and Vyzula R: MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer* 8:102, 2009. Doi: 10.1186/1476-4598-8-102.
24. Macfarlane LA and Murphy PR: MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 11 (7):537-561, 2010.
25. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW and Burt RW: Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138 (6): 2044-2058, 2010.
26. Stoffel EM: Heritable Gastrointestinal Cancer Syndromes. *Gastroenterol Clin North Am* 45 (3): 509-527, 2016.
27. Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5):759-767, 1990.
28. Bhalla A, Zulfiqar M, Weindel M and Shidham VB: Molecular diagnostics in colorectal carcinoma. *Clin Lab Med* 33 (4):835-859, 2013.
29. Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5):646-674, 2011.
30. Fearon ER: Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Rev Pathol* 6:479-507, 2011.
31. Grady WM and Carethers JM: Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135 (4):1079-1099, 2008.
32. Carethers JM and Jung BH: Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 149 (5):1177-1190.e3, 2015.
33. Morley-Bunker A, Walker LC, Currie MJ, Pearson J and Eglinton T: Translating colorectal cancer genetics into clinically useful biomarkers. *Colorectal Dis* 18 (8):749-762, 2016.
34. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr and Kinzler KW: Cancer genome landscapes. *Science* 339 (6127):1546-1558, 2013.
35. Fearon ER and Carethers JM: Molecular subtyping of colorectal cancer: time to explore both intertumoral and intratumoral heterogeneity to evaluate patient outcome. *Gastroenterology* 148 (1):10-13, 2015.
36. Bosman F and Yan P: Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol* 65(4) : 257-266, 2014.
37. Langner C: Serrated and non-serrated precursor lesions of colorectal cancer. *Dig Dis* 33 (1):28-37, 2015.
38. Tomasetti C, Marchionni L, Nowak MA, Parmigiani G and Vogelstein B: Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 112 (1):118-123, 2015.
39. Pino MS and Chung DC: The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138 (6):2059-2072, 2010.

40. Kumar, Abbas and Aster. Robbins and Kotran Pathologic Basis of Disease, 9th edition. Chapters 7 (Neoplasia, p.p. 265-340) and 17 (The Gastrointestinal Tract, p.p. 749-820). ELSEVIER SAUNDERS, 2015.
41. Jass JR: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50 (1): 113-130, 2007.
42. Leggett B and Whitehall V: Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 138 (6):2088-2100, 2010.
43. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B and Whitehall V: The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 62 (3):367-386, 2013.
44. Dudley J, Tseng LH, Rooper L, Harris M, Haley L, Chen G, Gocke CD, Eshleman JR and Lin MT: Challenges posed to pathologists in the detection of KRAS mutations in colorectal cancers. *Arch Pathol Lab Med* 139 (2):211-218, 2015.
45. Fearon ER and Wicha MS. KRAS and cancer stem cells in APC-mutant colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 106 (2):djt444, 2014. Doi: 10.1093/jnci/djt444.
46. Boland CR and Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138 (6):2073-2087.e3, 2010.
47. Aran V, Victorino AP, Thuler LC and Ferreira CG: Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clin Colorectal Cancer* 15(3):195-203, 2016.
48. Bogaert J and Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol* 27 (1): 9-14, 2014.
49. Qazi TM, O'Brien MJ, Farraye FA, Gould RW, Chen CA, Schroy PC 3rd: Epidemiology of goblet cell and microvesicular hyperplastic polyps. *Am J Gastroenterol* 109 (12):1922-1932, 2014.
50. Lambert R, Kudo SE, Vieth M, Allen JI, Fujii H, Fujii T, Kashida H, Matsuda T, Mori M, Saito H, Shimoda T, Tanaka S, Watanabe H, Sung JJ, Feld AD, Inadomi JM, O'Brien MJ, Lieberman DA, Ransohoff DF, Soetikno RM, Zauber A, Teixeira CR, Rey JF, Jaramillo E, Rubio CA, Van Gossum A, Jung M, Jass JR and Triadafilopoulos G: Pragmatic classification of superficial neoplastic colorectal lesions. *Gastrointest Endosc* 70 (6):1182-1199, 2009.
51. Levine JS and Ahnen DJ: Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med* 355 (24):2551-2557, 2006.
52. Leslie A, Carey FA, Pratt NR and Steele RJ. The colorectal adenoma - carcinoma sequence. *Br J Surg* 89 (7):845-860, 2002.
53. Boman BM and Fields JZ: An APC: WNT Counter-Current-Like Mechanism Regulates Cell Division Along the Human Colonic Crypt Axis: A Mechanism That Explains How APC Mutations Induce Proliferative Abnormalities That Drive Colon Cancer Development. *Front Oncol* 3:244, 2013. Doi: 10.3389/fonc.2013.00244.
54. Humphries A and Wright NA: Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 8 (6):415-424, 2008.
55. Zeki SS, Graham TA and Wright NA: Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8 (2): 90-100, 2011.
56. Cui S and Chang PY: Current understanding concerning intestinal stem cells. *World J Gastroenterol* 22 (31):7099-7110, 2016.
57. Tsubouchi S and Leblond CP: Migration and turnover of entero-endocrine and caveolated cells in the epithelium of the descending colon, as shown by

- radioautography after continuous infusion of 3H-thymidine into mice. *Am J Anat* 156 (4):431-451, 1979.
58. Zeuner A, Todaro M, Stassi G and De Maria R: Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell* 15 (6):692-705, 2014.
 59. Robert A. Weinberg. The biology of Cancer, 2nd edition. Chapters 6 (Cytoplasmic Signaling Circuitry Programs Many of the Traits of Cancer, p.p. 175-230) and 7 (Tumor Suppressor Genes, p.p. 231-274). Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2014.
 60. Derry MM, Raina K, Agarwal C and Agarwal R. Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol* 23:119, 2013. Doi: 10.3389/fonc.2013.00119. ECollection 2013.
 61. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, van Es JH, Clevers H and Lowe SW. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell* 161 (7):1539-1552, 2015.
 62. Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R and Clevers H: The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111: 241-250, 2002.
 63. Pretlow TP and Pretlow TG: Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta* 1756 (2):83-96, 2005.
 64. Perse Martina and Cerar Anton: The Role, Significance and Applicability of Aberrant Crypt Foci in Clinical Practice, chapter 18 (p.p. 467-478), included in the book: *Colorectal Cancer – Surgery, Diagnostics and Treatment*, edited by Jim Khan, InTech, 2014, DOI: 10.5772/50593.
 65. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ and Clevers H: Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457 (7229):608-611, 2009.
 66. Obuch JC and Ahnen DJ: Colorectal Cancer: Genetics is Changing Everything. *Gastroenterol Clin North Am* 45 (3):459-476, 2016.
 67. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM and Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319 (9):525-532, 1988.
 68. Bienz M and Clevers H: Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103 (2): 311-320, 2000.
 69. Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F and Slattery ML: Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* 59: 1442-1444, 1999.
 70. Masuda M, Sawa M and Yamada T: Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: Feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer. *Pharmacol Ther* 156:1-9, 2015.
 71. Kwong LN and Dove WF: APC and its modifiers in colon cancer. *Adv Exp Med Biol* 656:85-106, 2009.
 72. Ahearn TU, Shaukat A, Flanders WD, Seabrook ME and Bostick RM: Markers of the APC/ β -catenin signaling pathway as potential treatable, preneoplastic biomarkers of risk for colorectal neoplasms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21 (6):969-979, 2012.

73. Halazonetis TD, Gorgoulis VG and Bartek J: An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319 (5868):1352-1355, 2008.
74. Pan JS, Hong MZ and Ren JL: Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol* 15 (14):1702-1707, 2009.
75. Ogrunc M, Di Micco R, Lontos M, Bombardelli L, Mione M, Fumagalli M, Gorgoulis VG and d'Adda di Fagagna F: Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death Differ* 21 (6):998-1012, 2014.
76. D' Abaco GM, Whitehead RH and Burgess AW: Synergy between Apc min and an activated ras mutation is sufficient to induce colon carcinomas. *Mol Cell Biol* 16 (3): 884-991, 1996.
77. Zauber NP, Sabbath-Solitare M, Marotta SP and Bishop DT: K-ras mutation and loss of heterozygosity of the adenomatous polyposis coli gene in patients with colorectal adenomas with in situ carcinoma. *Cancer* 86 (1) : 31-36, 1999.
78. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B and Kinzler KW: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359 (6392): 235-237, 1992.
79. Poulogiannis G, Luo F and Arends MJ: RAS signalling in the colorectum in health and disease. *Cell Commun Adhes* 19 (1):1-9, 2012.
80. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ and Leggett BA: Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 13 (28): 3784-791, 2007.
81. Moon BS, Jeong WJ, Park J, Kim TI, Min do S and Choi KY: Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. *J Natl Cancer Inst* 106 (2):djt373, 2014. Doi: 10.1093/jnci/djt373.
82. Feng Y, Bommer GT, Zhao J, Green M, Sands E, Zhai Y, Brown K, Burberry A, Cho KR and Fearon ER: Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterology* 141 (3): 1003-1013.e1-10, 2011.
83. Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, Rosty C, Abal M, El Marjou F, Smits R, Louvard D, Fodde R and Robine S: APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 131 (4):1096-1109, 2006.
84. Horst D, Chen J, Morikawa T, Ogino S, Kirchner T and Shivdasani RA: Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Res* 72 (6):1547-1556, 2012.
85. Velho S and Haigis KM: Regulation of homeostasis and oncogenesis in the intestinal epithelium by Ras. *Exp Cell Res* 317 (19): 2732-2739, 2011.
86. Le Rolle AF, Chiu TK, Zeng Z, Shia J, Weiser MR, Paty PB and Chiu VK: Oncogenic KRAS activates an embryonic stem cell-like program in human colon cancer initiation. *Oncotarget* 7 (3):2159-2174, 2016.
87. Kinzler KW and Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 (2):159-170, 1996.
88. Jeong WJ, Yoon J, Park JC, Lee SH, Lee SH, Kaduwal S, Kim H, Yoon JB and Choi KY: Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis. *Sci Signal* 5 (219):ra30, 2012.

89. Park KS, Jeon SH, Kim SE, Bahk YY, Holmen SL, Williams BO, Chung KC, Surh YJ and Choi KY: APC inhibits ERK pathway activation and cellular proliferation induced by RAS. *J Cell Sci* 119: 819-827, 2006.
90. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, Broadbent T, Sarkar S, Burt RW and Jones DA: A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 137: 623-634, 2009.
91. Li J, Mizukami Y, Zhang X, Jo WS and Chung DC: Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3 β . *Gastroenterology* 128: 1907-1918, 2005.
92. Castellano E and Downward J: RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2 (3):261-274, 2011.
93. Lemieux E, Cagnol S, Beaudry K, Carrier J and Rivard N: Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene* 34: 4914-4927, 2015.
94. Malumbres M and Barbacid M: RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3 (6):459-465, 2003. Doi: 10.1038/nrc1097. Review. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2003 Sep; 3 (9):708.
95. Karnoub AE and Weinberg RA: Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (7):517-531, 2008.
96. Downward J: Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3 (1):11-22, 2003.
97. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E and Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 11 (11): 761-774, 2011.
98. Leon J, Guerrero I and Pellicer A: Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* 7 (4):1535-1540, 1987.
99. Diaz R, Lue J, Mathews J, Yoon A, Ahn D, Garcia-España A, Leonardi P, Vargas MP and Pellicer A: Inhibition of Ras oncogenic activity by Ras protooncogenes. *Int J Cancer* 113 (2): 241-248, 2005.
100. Omerovic J and Prior IA: Compartmentalized signalling: Ras proteins and signalling nanoclusters. *FEBS J* 276 (7): 1817-1825, 2009.
101. Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Pérez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD and Philips MR : PKC regulates a farnesylelectrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* 21:481-493, 2006.
102. Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV and Gallinger S: Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 54: 5527-5530, 1994.
103. Diaz R, Lopez-Barcons L, Ahn D, Garcia-Espana A, Yoon A, Matthews J, Manges R, Perez-Soler R and Pellicer A: Complex effect of Ras proto-oncogenes in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 25 (4):535-539, 2004.
104. Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, Johnson L, Liu G, Li J, Anderson MW, Sills RC, Hong HL, Devereux TR, Jacks T, Guan KL and You M: Wild type Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nature Genet* 29: 25-33, 2001.
105. Diaz R, Ahn D, Lopez-Barcons L, Malumbres M, Perez de Castro I, Lue J, Ferrer-Miralles N, Manges R, Tsong J, Garcia R, Perez-Soler R and Pellicer A: The N-ras protooncogene can suppress the malignant phenotype in the presence or absence of its oncogene. *Cancer Res* 62: 4514-4518, 2002.

106. James RM, Arends MJ, Plowman SJ, Brooks DG, Miles CG, West JD and Patek CE: K-ras proto-oncogene exhibits tumor suppressor activity as its absence promotes tumorigenesis in murine teratomas. *Mol Cancer Res* 1: 820-825, 2003.
107. Ise K, Nakamura K, Nakao K, Shimizu S, Harada H, Ichise T, Miyoshi J, Gondo Y, Ishikawa T, Aiba A and Katsuki M: Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 19:2951-2956, 2000.
108. Liu ML, Shibata MA, Von Lintig FC, Wang W, Cassenaer S, Boss GR and Green JE: Haploid loss of Ki-ras delays mammary tumor progression in C3 (1)/SV40 Tag transgenic mice. *Oncogene* 20: 2044-2049, 2001.
109. Luo F, Poulogiannis G, Ye H, Hamoudi R, Dong G, Zhang W, Ibrahim AE and Arends MJ: Wild-type K-ras has a tumour suppressor effect on carcinogen-induced murine colorectal adenoma formation. *Int J Exp Pathol* 95(1):8-15, 2014.
110. Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R and Jacks T: K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11:2468-2481, 1997.
111. Kumar, Kotran and Robbins, Basic Pathology, 7th edition, International Edition, SAUNDERS, 2003, chapter 6, Neoplasia, p.p. 165-210, figure 6-18.
112. Sevignani C, Wlodarski P, Kirillova J, Mercer WE, Danielson KG, Iozzo RV and Calabretta B: Tumorigenic conversion of p53-deficient colon epithelial cells by an activated Ki-ras gene. *J Clin Invest* 101 (8):1572-1580, 1998.
113. Luu C, Heinrich EL, Duldulao M, Arrington AK, Fakih M, Garcia-Aguilar J and Kim J: TP53 and let-7a micro-RNA regulate K-Ras activity in HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One* 8(8): e70604, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0070604. Print 2013.
114. Whelan JT, Hollis SE, Cha DS, Asch AS and Lee MH: Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol* 227 (3):1235-1241, 2012.
115. Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F, Carneiro F, Oliveira C and Seruca R: BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer* 8:255, 2008. Doi: 10.1186/1471-2407-8-255.
116. Ahn DH, Ciombor KK, Mikhail S and Bekaii-Saab T: Genomic diversity of colorectal cancer: Changing landscape and emerging targets. *World J Gastroenterol* 22 (25):5668-5677, 2016.
117. Ronai Z: ras oncogene detection in pre-neoplastic lesions: possible applications for diagnosis and prevention. *Oncol Res* ;4 (2):45-48, 1992.
118. Ishii M, Sugai T, Habano W and Nakamura S: Analysis of Ki-ras gene mutations within the same tumor using a single tumor crypt in colorectal carcinomas. *J Gastroenterol* 39 (6):544-549, 2004.
119. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, Satoh T, Takimoto R, Kato J, Sakamaki S and Niitsu Y: Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121 (3):599-611, 2001.

120. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J and Rosenberg J: Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World J Gastroenterol* 20 (48):18151-18164, 2014.
121. Yadamsuren EA, Nagy S, Pajor L, Lacza A and Bogner B: Characteristics of advanced and non advanced sporadic polypoid colorectal adenomas: correlation to KRAS mutations. *Pathol Oncol Res* 18 (4):1077-1084, 2012.
122. Einspahr JG, Martinez ME, Jiang R, Hsu CH, Rashid A, Bhattacharria AK, Ahnen DJ, Jacobs ET, Houlihan PS, Webb CR, Alberts DS and Hamilton SR: Associations of Ki-ras proto-oncogene mutation and p53 gene overexpression in sporadic colorectal adenomas with demographic and clinicopathologic characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (8):1443-1450, 2006.
123. Morkel M, Riemer P, Bläker H and Sers C: Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget* 6 (25):20785-20800, 2015.
124. Kumar R, Sukumar S and Barbacid M: Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 248 (4959):1101-1104, 1990.
125. Zhu D, Keohavong P, Finkelstein SD, Swalsky P, Bakker A, Weissfeld J, Srivastava S and Whiteside TL: K-ras gene mutations in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients. *Cancer Res* 57 (12):2485-2492, 1997.
126. Hagag N, Diamond L, Palermo R and Lyubsky S: High expression of ras p21 correlates with increased rate of abnormal mitosis in NIH3T3 cells. *Oncogene* 5:1481-1489, 1990.
127. Denko N, Stringer J, Wani M and Stambrook P: Mitotic and post mitotic consequences of genomic instability induced by oncogenic Ha-ras. *Somat Cell Mol Genet* 21:241-253, 1995.
128. Denko NC, Giaccia AJ, Stringer JR and Stambrook PJ: The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5124-5128, 1994.
129. Wani MA, Denko NC and Stambrook PJ: Expression of Rap 1 suppresses genomic instability of H-ras transformed mouse fibroblasts. *Somat Cell Mol Genet* 23:123-133, 1997.
130. Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V and Barbacid M: Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4:111-120, 2003.
131. Tsunoda T, Takashima Y, Fujimoto T, Koyanagi M, Yoshida Y, Doi K, Tanaka Y, Kuroki M, Sasazuki T and Shirasawa S: Three-dimensionally specific inhibition of DNA repair-related genes by activated KRAS in colon crypt model. *Neoplasia* 12 (5):397-404, 2010.
132. Zauber P, Marotta S and Sabbath-Solitare M: Colorectal Cancers with the Uncommon Findings of KRAS Mutation and Microsatellite Instability. *Cytogenet Genome Res* 146 (4):261-267, 2015.
133. Yang G, Mercado-Urbe I, Multani AS, Sen S, Shih IeM, Wong KK, Gershenson DM and Liu J: RAS promotes tumorigenesis through genomic instability induced by imbalanced expression of Aurora-A and BRCA2 in midbody during cytokinesis. *Int J Cancer* 133 (2):275-285, 2013. Doi: 10.1002/ijc.28032. Epub 2013 Feb 12. Erratum in: *Int J Cancer*. 2015 Sep 15; 137(6):E12.

134. Abulaiti A, Fikaris AJ, Tsygankova OM and Meinkoth JL: Ras induces chromosome instability and abrogation of the DNA damage response. *Cancer Res* 66:10505–10512, 2006.
135. Rao CV and Yamada HY: Genomic instability and colon carcinogenesis: from the perspective of genes. *Front Oncol* 3:130, 2013. Doi: 10.3389/fonc.2013.00130. ECollection 2013.
136. Kamata T and Pritchard C: Mechanisms of aneuploidy induction by RAS and RAF oncogenes: *Am J Cancer Res* 1 (7):955-971, 2011.
137. Minamoto T, Yamashita N, Ochiai A, Mai M, Sugimura T, Ronai Z and Esumi H: Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer* 75 (6 Suppl):1520-1526, 1995.
138. Minamoto T, Ronai Z, Yamashita N, Ochiai A, Sugimura T, Mai M and Esumi H: Detection of Ki-ras mutation in non-neoplastic mucosa of Japanese patients with colorectal cancers. *Int J Oncol* 4 (2):397-401, 1994.
139. Luo F, Poulogiannis G, Ye H, Hamoudi R, Zhang W, Dong G and Arends MJ: Mutant K-ras promotes carcinogen-induced murine colorectal tumourigenesis, but does not alter tumour chromosome stability. *J Pathol* 223 (3):390-399, 2011.
140. Jacoby RF, Llor X, Teng BB, Davidson NO and Brasitus TA: Mutations in the K-ras oncogene induced by 1, 2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 87: 624-630, 1991.
141. Gorgoulis VG and Halazonetis TD: Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol* 22 (6):816-827, 2010.
142. Park MT, Kim MJ, Suh Y, Kim RK, Kim H, Lim EJ, Yoo KC, Lee GH, Kim YH, Hwang SG, Yi JM and Lee SJ: Novel signaling axis for ROS generation during K-Ras-induced cellular transformation. *Cell Death Differ* 21: 1185-1197, 2014.
143. Grabocka E, Commisso C and Bar-Sagi D: Molecular pathways: targeting the dependence of mutant RAS cancers on the DNA damage response. *Clin Cancer Res* 21: 1243-1247, 2015.
144. Grabocka E, Pylayeva-Gupta Y, Jones MJ, Lubkov V, Yemanaberhan E, Taylor L, Jeng HH and Bar-Sagi D: Wild-type H- and N-Ras promote mutant K-Ras-driven tumorigenesis by modulating the DNA damage response. *Cancer Cell* 25: 243-256, 2014.
145. Yamada S, Yashiro M, Maeda K, Nishiguchi Y and Hirakawa K: A novel high-specificity approach for colorectal neoplasia: Detection of K ras2 oncogene mutation in normal mucosa. *Int J Cancer* 113 (6):1015-1021, 2005.
146. Slattery ML, Anderson K, Curtin K, Ma K, Schaffer D, Edwards S and Samowitz W: Lifestyle factors and Ki-ras mutations in colon cancer tumors. *Mutat Res* 483 (1-2):73-81, 2001.
147. Weijenberg MP, Aardening PW, de Kok TM, de Goeij AF and van den Brandt PA: Cigarette smoking and KRAS oncogene mutations in sporadic colorectal cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *Mutat Res* 652 (1):54-64, 2008.
148. Bongaerts BW, de Goeij AF, van den Brandt PA and Weijenberg MP: Alcohol and the risk of colon and rectal cancer with mutations in the K-ras gene. *Alcohol* 38 (3):147-154, 2006.
149. Tobi M, Luo FC and Ronai Z: Detection of K-ras mutation in colonic effluent samples from patients without evidence of colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 86 (13):1007-1010, 1994.

150. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P and Vogelstein B: Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256 (5053):102-105, 1992.
151. Vieth M, Quirke P, Lambert R, von Karsa L and Risio M: Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis: annotations of colorectal lesions. *Virchows Arch* 458 (1):21-30, 2011. Doi: 10.1007/s00428-010-0997-2. Annex to Quirke et al.
152. Nagorni A, Katic V, Zivkovic V and Stanojevic G: Advanced colorectal adenoma. *Arch Oncol* 12 (Supl 1) : 59-60, 2004.
153. Κώδικας Ιατρικής Δεοντολογίας. Εφημερίδα της Κυβερνήσεως 28/11/2005, Νόμος υπ' αριθμ 3418.
154. The declaration of Helsinki, Bulletin of World Health Organization, 79 (4), p.p. 373-374, 2001.
155. Yanai S, Nakamura S and Matsumoto T: What would be the best diagnostic strategy of colonoscopy for colorectal neoplasia? The role of magnifying colonoscopy for the diagnosis of colorectal neoplasms: From Japanese colonoscopists' perspective. *Dig Endosc* 2015 Nov 4. Doi: 10.1111/den.12568.
156. Ronai Z, Luo F, Gradia S, Hart W and Butler R: Detection of K-ras mutation in normal and malignant colonic tissues by an enriched PCR method. *Int J Oncol* 4 (2):391-396, 1994.
157. Ronai Z, Minamoto T, Butler R, Tobi M, Luo FQ, Zang E, Esumi H and Sugimura T: Sampling method as a key factor in identifying K-ras oncogene mutations in preneoplastic colorectal lesions. *Cancer Detect Prev* 19 (6):512-517, 1995.
158. Losi L, Baisse B, Bouzourene H and Benhattar: Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *J. Carcinogenesis* 26 (5): 916-922, 2005.
159. Kiernan John A: Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy today 00-1*: 8-12, 2000.
160. Rhodes Anthony: Fixation of tissues. Chapter 4, p.p. 69-90, in the book "Bancroft's Theory and practice of histological techniques, ELSEVIER, 2013.
161. Riddell RH, Petras RE, Williams GT, Sobin LH, Eds: Tumors of the Intestines. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA, 2003.
162. Hamilton ST, Aaltonen LA, Eds: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization Classification of Tumours. Oxford University Press, New York, NY, USA, 2001.
163. Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M and Watanabe H: Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 82: 60–69, 1998.
164. Toll AD, Fabius D, Hyslop T, Pequignot E, DiMarino AJ, Infantolino A and Palazzo JP: Prognostic significance of high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Colorectal Dis* 13 (4):370-373, 2011.
165. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Fléjou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda

- T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H and Yamabe H: The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 47: 251–255, 2000.
166. Stolte M: The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: advantages and disadvantages. *Virchows Arch* 442 (2):99-106, 2003.
167. Rex DK, Goldblum JR, Appelman HD and Odze R: Should HGD or degree of villous change in colon polyps be reported? *Am J Gastroenterol* 103: 1327–1333, 2008.
168. Εφαρμογές μοριακής διαγνωστικής. Πλαγιάς Π., Γεροβασίλη Α., Παπαϊωάννου Α. Κεφάλαια : **4** : απομόνωση νουκλεϊκών οξέων, DNA, RNA, σσ 153-164, **5** : φασματοφωτομετρία νουκλεϊκών οξέων, σσ 165-184, **6** : αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, σσ 185-224, **7** : περιοριστικές ενδονουκλεάσες, σσ 225-246, **8** : ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων, σσ 247-294 και **11** : υβριδισμός, σσ 361-403. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2011.
169. QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook, pp 1-21, QIAGEN, April 2010
170. Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N and Ronai Z: Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene* 6 (6):1079-1083, 1991.
171. Li J, Wang Z, Yuan X, Xu L and Tong J : The prognostic significance of age in operated and non-operated colorectal cancer. *BMC Cancer* 25:15:83, 2015.
172. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N and Sung MK: Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol* 21(17):5167-5175, 2015.
173. Morris RG, Curtis LJ, Romanowski P, Hardcastle JD, Jenkins DA, Robinson M, Wyllie AH and Bird CC: Ki-ras mutations in adenomas: a characteristic of cancer-bearing colorectal mucosa. *J Pathol* 180 (4):357-363, 1996.
174. Barry EL, Baron JA, Grau MV, Wallace K and Haile RW: K-ras mutations in incident sporadic colorectal adenomas. *Cancer* 106 (5):1036-1040, 2006.
175. Rashid A, Zahurak M, Goodman SN and Hamilton SR: Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut* 44 (6):826-833, 1999.
176. Zauber NP, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Zauber AG and Bishop DT: Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in colorectal adenomas and carcinomas arising in the same patient. *J Pathol* 193 (3):303-309, 2001.
177. Chen H, Lefferts JA, Schwab MC, Suriawinata AA and Tsongalis GJ: Correlation of polypoid colorectal adenocarcinoma with pre-existing adenomatous polyps and KRAS mutation. *Cancer Genet* 204 (5):245-251, 2011.
178. Konishi K, Yamochi T, Makino R, Kaneko K, Yamamoto T, Nozawa H, Katagiri A, Ito H, Nakayama K, Ota H, Mitamura K and Imawari M: Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas. *Clin Cancer Res* 10 (9):3082-3090, 2004.
179. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lövig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum

- TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K and Urosevic N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85 (5):692-696, 2001.
180. Zauber P, Marotta S and Sabbath-Solitare M: KRAS gene mutations are more common in colorectal villous adenomas and in situ carcinomas than in carcinomas. *Int J Mol Epidemiol Genet* 4 (1):1-10, 2013.
181. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR and Clarke PA: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 90 (9):675-684, 1998.
182. Lin MT, Mosier SL, Thiess M, Beierl KF, Debeljak M, Tseng LH, Chen G, Yegnasubramanian S, Ho H, Cope L, Wheelan SJ, Gocke CD and Eshleman JR: Clinical validation of KRAS, BRAF, and EGFR mutation detection using next-generation sequencing. *Am J Clin Pathol* 141 (6):856-866, 2014.
183. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ and Vogelstein B: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327 (6120):293-297, 1987.
184. Bos JL: The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 195 (3):255-271, 1988.
185. Bos JL: ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49 (17):4682-4689, 1989. Review. Erratum in: *Cancer Res* 1990 Feb 15; 50 (4):1352.
186. Salhab N, Jones DJ, Bos JL, Kinsella A and Schofield PF: Detection of ras gene alterations and ras proteins in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 32 (8):659-664, 1989.
187. Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, Hibi K, Goodman SN, D'Allesio M, Paty P, Hamilton SR, Sidransky D, Barany F, Levin B, Shuber A, Kinzler KW, Vogelstein B and Jen J: Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 93 (11):858-865, 2001.
188. Zauber NP, Sabbath-Solitare M, Marotta S, Perera LP and Bishop DT: Diagn Adequacy of colonoscopic biopsy specimens for molecular analysis: a comparative study with colectomy tissue. *Mol Pathol* 15 (3):162-168, 2006.
189. Minamoto T, Yamashita N, Ochiai A, Mai M, Sugimura T, Ronai Z and Esumi H. Analysis of mutant K-ras in multiple sites of normal appearing mucosa of colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 9 (5) : 911-915, 1996.
190. Hershkovitz D, Simon E, Bick T, Prinz E, Noy S, Sabo E, Ben-Izhak O and Vieth M: Adenoma and carcinoma components in colonic tumors show discordance for KRAS mutation. *Hum Pathol* 45 (9):1866-1871, 2014.
191. Jacoby RF, Llor X, Teng BB, Davidson NO and Brasitus TA: Mutations in the K-ras oncogene induced by 1, 2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 87 (2) : 624-630, 1991.
192. Maltzman T, Knoll K, Martinez ME, Byers T, Stevens BR, Marshall JR, Reid ME, Einspahr J, Hart N, Bhattacharyya AK, Kramer CB, Sampliner R, Alberts DS and Ahnen DJ: Ki-ras proto-oncogene mutations in sporadic colorectal adenomas: relationship to histologic and clinical characteristics. *Gastroenterology* 121 (2) : 302-309, 2001.

193. Jass JR: Hyperplastic-like polyps as precursors of microsatellite-unstable colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 119 (6): 773-775, 2003.
194. Jass JR, Iino H, Ruzskiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, Cohn D, Furlong KL, Walsh MD, Palazzo J, Edmonston TB, Fishel R, Young J and Leggett BA: Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut* 47 (1):43-49, 2000.
195. Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, Carter H, Kim D, Chen S, Karchin R, Kinzler KW, Vogelstein B and Nowak MA: Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (43):18545-18550, 2010.
196. Regoes RR: Population genetics meets cancer genomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (43):18241-18242, 2010.
197. Siyar Ekin A, Demirci U, Cakmak Oksuzoglu B, Ozturk A, Esbah O, Ozatli T, Celik B, Budakoglu B, Turker I, Bal O, and Turan N: KRAS discordance between primary and metastatic tumor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J BUON* 20 (1):128-135, 2015.
198. Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO and Gaudernack G: K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer* 69 : 367-371, 1994.
199. Luo F, Brooks DG, Ye H, Hamoudi R, Poulogiannis G, Patek CE, Winton DJ and Arends MJ: Conditional expression of mutated K-ras accelerates intestinal tumorigenesis in Msh2-deficient mice. *Oncogene* 26 (30) : 4415-4427, 2007.
200. Sovich JL, Sartor Z and Misra S: Developments in Screening Tests and Strategies for Colorectal Cancer. *Biomed Res Int* 2015; 2015:326728. Doi: 10.1155/2015/326728. Epub 2015 Oct 4.
201. Heresbach D, Barrioz T, Lapalus MG, Coumaros D, Bauret P, Potier P, Sautereau D, Boustière C, Grimaud JC, Barthélémy C, Sée J, Serraj I, D'Halluin PN, Branger B and Ponchon T: Miss rate for colorectal neoplastic polyps: a prospective multicenter study of back-to-back video colonoscopies. *Endoscopy* 40 (4): 284-290, 2008.
202. Chretien AS, Harlé A, Meyer-Lefebvre M, Rouyer M, Husson M, Ramacci C, Harter V, Genin P, Leroux A and Merlin JL: Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* 2 (1) :11-20, 2013.