



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ανοσολογία και φλεγμονή στον καρκίνο»

ΘΕΟΔΩΡΟΥ ΣΟΦΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΜ 41610

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Αθανάσιος Κοτσίνας, Επίκουρος Καθηγητής
Τομέας Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανάσιος Κοτσίνας (Επιβλέπων Καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής Ιστολογίας και Εμβρυολογίας

Τομέας Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου και Ηλεκτρονικής
Μικροσκοπίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας

Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

Σοφία Χαβάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια Ιστολογίας και Εμβρυολογίας

Τομέας Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΕΚΠΟΝΗΣΗ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιατρική Σχολή

Τομέας Ιστολογίας και Εμβρυολογίας

Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας

Ομάδα «Μοριακής Καρκινογένεσης»

Στην οικογένειά μου και στο Δημήτρη...

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» και αποτελεί ένα μικρό τμήμα μίας ερευνητικής μελέτης, η οποία βρίσκεται σε εξέλιξη, στα πλαίσια συνεργασίας του εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και του εργαστηρίου της Καθηγήτριας Teresa Frisan (Umea University, Sweden).

Η διεξαγωγή της διπλωματικής εργασίας έγινε στο εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ με επιβλέπων τον Επίκουρο Καθηγητή κο Αθανάσιο Κοτσίνα, τον οποίο και ευχαριστώ από καρδιάς για την τιμή που μου έκανε να με αναλάβει ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να πω στον Επίκουρο Καθηγητή κο Ιωάννη Πατέρα, ο οποίος μπορεί να μην είναι στην τριμελή εξεταστική μου επιτροπή, όμως με καθοδήγησε, με ενέπνευσε, με εμπιστεύτηκε να αναλάβω σημαντικές ερευνητικές μελέτες, αλλά και υποστήριξε και συνεχίζει να υποστηρίζει την αγάπη μου για την Ανοσολογία του Καρκίνου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Τομέα Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, κο Βασίλειο Γοργούλη που με δέχτηκε από την πρώτη μέρα με χαρά στο εργαστήριο και στην ομάδα Μοριακής Καρκινογένεσης, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Σοφία Χαβάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ κο Ιωάννη Τρουγκάκο γιατί κατάφεραν να με εμπνεύσουν ως επιστήμονες κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Αισθάνομαι πολύ τυχερή που έχω τη δυνατότητα να συνεργάζομαι με την Καθηγήτρια Teresa Frisan (Umea University και Karolinska Institutet, Σουηδία), καθώς και με την Lisa Del Bell Belluz και την Océane Martin που ανήκουν στην ερευνητική της ομάδα και τους οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ που με εμπιστεύτηκαν. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Dr Tak Mak (Princess Margaret Cancer Centre, The University Health Network, Toronto Canada) που μας παρείχε τα διαγονιδιακά ποντίκια για τη μελέτη, καθώς και τον Drew Wakeham (Campbell Family Institute for Breast Cancer Research / PMH / UHN) από το εργαστήριό του για την πολύτιμη βοήθεια.

Πάνω από όλους και όλα όμως, χρωστώ ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου και στον Δημήτρη που με στηρίζουν και με εμπιστεύονται όλα αυτά τα χρόνια και στέκονται στο πλάι μου περήφανοι σε κάθε βήμα που κάνω στη ζωή μου. Χωρίς αυτούς και την αγάπη τους δε θα τα είχα καταφέρει όλα αυτά.

Περίληψη

Ο καρκίνος είναι μια δυνητικά θανατηφόρος νόσος με υψηλή επίπτωση σε παγκόσμιο επίπεδο. Η καρκινογένεση αποτελεί μία πολυσταδιακή διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται πολύπλοκοι παθογενετικοί μηχανισμοί, οι οποίοι περιλαμβάνουν γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις, καθώς και αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν κάποια συγκεκριμένα κοινά, μοριακά και κυτταρικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι α) η ικανότητα αύξησης ανεξάρτητα από μιτογόνα ή αυξητικά ερεθίσματα, β) η απευαισθητοποίηση σε αντι-αυξητικά σήματα, γ) η αποφυγή της απόπτωσης, δ) η ικανότητα αέναου πολλαπλασιασμού, ε) η επαγωγή της αγγειογένεσης, στ) η ικανότητα διήθησης και μετάστασης, ζ) η γενωμική αστάθεια, η) η διαφυγή από την ανοσοεπιτήρηση, θ) η προαγωγή της ογκογένεσης μέσω της φλεγμονής και ι) ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού.

Με τον όρο φλεγμονή αναφερόμαστε στο σύνολο των τοπικών και συστηματικών μηχανισμών που ενεργοποιεί ο οργανισμός ως απάντηση : α) στη δράση βλαπτικών παραγόντων ή β) στην απόκλιση από το φυσιολογικό κάποιων στοιχείων που επηρεάζουν τη κυτταρική και ιστική ομοιοστασία. Οι χρόνιες λοιμώξεις από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (ιούς, βακτήρια, παράσιτα) έχει δείχθει πως αυξάνουν τον κίνδυνο μετέπειτα ανάπτυξης καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου η οποία έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκινωμάτων στο γαστρεντερικό σωλήνα (ορθοκολικός καρκίνος). Περίπου 20% των καρκίνων παγκοσμίως σχετίζεται με την ύπαρξη άλυτης λοίμωξης ή χρόνιας φλεγμονής. Ο ρόλος της ανοσίας και της φλεγμονής είναι καίριας σημασίας, διότι η φλεγμονή μπορεί να συμβάλλει στην έναρξη και εξέλιξη της καρκινογένεσης μέσω τροφοδότησης του μικροπεριβάλλοντος με παράγοντες που επάγουν την αύξηση, επιβίωση, αγγειογένεση, αλλά και μέσω της παραγωγής ROS με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία γενωμικής αστάθειας. Από την άλλη, η ανοσοεπιτήρηση συμβάλλει στην πρώιμη ανίχνευση κι εξουδετέρωση των μετασχηματισμένων καρκινικών, αλλά και στην καταστροφή τους στην προσπάθειά τους να μετασταθούν.

Η ομοιοστασία της εντερικής μικροχλωρίδας είναι απαραίτητο να διατηρείται, διότι έχει δείχθει πως η ύπαρξη μεταβολής στο μικροβίωμα και η επικράτηση παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να προκαλέσει εντερική φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης

υποδοχέων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοτίβα (PRRs) ή μέσω ενδοκύττωσης ή προσκόλλησης ή και έκκρισης τοξινών. Υπάρχουν τρία είδη τοξινών, α) οι CDT τοξίνες, β) η τυφοειδής τοξίνη και γ) η τοξίνη colibactin. Οι δύο πρώτες προκαλούν δικλωνικές θραύσεις στο DNA και επαγωγή του μηχανισμού απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR) και εάν δεν επιδιορθωθούν είναι δυνατό να προάγουν τον καρκινικό μετασχηματισμό στο έντερο.

Ορμώμενοι από ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την τυφοειδή τοξίνη, προχωρήσαμε στη μελέτη της επίδρασης της χορήγησης στελεχών *Salmonella Typhimurium* τα οποία εκφράζουν την ενεργό (TT) ή την ανενεργό μορφή (Delta) της τυφοειδούς τοξίνης σε διαγονιδιακά ποντίκια που έχουν τους ακόλουθους γονότυπους: WT (wild type), *TP53* heterozygous (+/-), *TP53* KO (knock out, -/-), *ATM* heterozygous (+/-), *ATM* KO (knock out, -/-). Σκοπός μας ήταν να δούμε ποια είναι η επίδραση της τυφοειδούς τοξίνης στην ομοιοστασία του εντέρου και ειδικότερα σε ποντίκια στα οποία έχουν απαλειφθεί πλήρως ή μερικώς ο κύριος ανοδικός ρυθμιστής του μονοπατιού του DDR (ATM) και ο βασικός τελεστής του DDR (το p53).

Για να απαντηθούν τα συγκεκριμένα ερωτήματα προχωρήσαμε σε ιστολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη των συγκεκριμένων περιστατικών. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας οδήγησε στα εξής συμπεράσματα: πρώτον, παρατηρήθηκε μείωση της βαρύτητας της φλεγμονής στο παχύ και στο λεπτό έντερο ποντικών που έλαβαν την ενεργό τοξίνη, αλλά και μείωση των επιπέδων του γH2AX που αποτελεί καθιερωμένο δείκτη ύπαρξης δικλωνικών θραύσεων. Εξετάζοντας τον παράγοντα p65/NF-κB, ο οποίος είναι ο κύριος ρυθμιστής της φλεγμονής παρατηρήσαμε στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα στα ποντίκια που έλαβαν την αδρανή τοξίνη, έναντι αυτών που έλαβαν την ενεργό μορφή. Επιπλέον, φαίνεται μέσω εξέτασης δύο δεικτών για T και B λεμφοκύτταρα, η τυφοειδής τοξίνη να έχει ανοσορρυθμιστικό ρόλο.

Με βάση τα ανωτέρω, η παρουσία της τυφοειδούς τοξίνης επηρεάζει την ομοιοστασία του εντέρου. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω αναλύσεις προκειμένου να ρίξουμε φως στους υποκείμενους μηχανισμούς.

Summary

Cancer is a potentially lethal disease, characterized by high prevalence. Carcinogenesis is a multistep process in which complex pathogenetic mechanisms are involved, including genetic and epigenetic aberrations and an interplay between genetic and environmental factors. The cancer cells acquire some capacities; known as the hallmarks of cancer: a) sustaining proliferative signaling, b) evading growth suppressors, c) avoiding immune destruction, d) enabling replicative immortality, e) tumor-promoting inflammation, f) activating invasion and metastasis, g) inducing angiogenesis, h) genomic instability, i) resisting cell death and j) deregulating cellular energetics.

Inflammation is the biological response to harmful stimuli or loss of cellular and tissue homeostasis. Chronic infection and inflammation are correlated with a high risk of cancer development. IBD is a major example, since was shown to be correlated with the development of colorectal carcinomas. Almost 20% of cancer incidents worldwide are associated with the existence of a persistent infection or chronic inflammation. The role of immunity and inflammation is crucial, since inflammation can contribute to the initiation and progression of carcinogenesis by supplying the tumor microenvironment with growth, survival and angiogenetic factors and also ROS, thus leading to genomic instability. However immunosurveillance contributes to an early detection and elimination of transformed cancer cells, during the initiation or the metastatic stage.

Homeostasis of the gut microflora is crucial to be maintained, since changes in the microbiome and the domination of pathogen microorganisms can lead to intestinal inflammation through PRRs activation or through endocytosis or adhesion or toxin secretion. There are three types of toxins known: a)cytolethal distending toxins (CDTs), b) typhoid toxin and c) colibactin. The first two types create double-strand DNA breaks and thus activate the DNA damage response mechanism. If the DNA lesions cannot be repaired, cancer transformation is possible to take place.

Fueled by the latest scientific data regarding the typhoid toxin, we studied the effect of administrating *Salmonella Typhimurium* strains that can express (TT) or not (Delta) the active typhoid toxin to transgenic mice with the following genotypes: WT (wild type), *TP53* heterozygous (+/-), *TP53* KO (knockout), *ATM* heterozygous (+/-) and *ATM* KO. Our purpose is to clarify the effect of typhoid toxin on the intestinal homeostasis and especially in mice where *ATM* and *p53* are fully or partially missing.

We conducted histological and immunohistochemical analysis, that lead to the following conclusions: inflammation of a lower severity and lower levels of the γ H2AX marker were observed in the intestines of the mice that received the active toxin (TT) in contrast to the mice that received the inactive form of the toxin (Delta). By examining p65/NF- κ B, which is the main regulator of inflammation, we observed statistically significant lower levels of the marker in mice that the inactive toxin was administered comparing to those that received the active form. Furthermore, the examination of two markers regarding T and B lymphocytes brought us to the conclusion that typhoid toxin has an immune modulator role.

Based on the above, the presence of the typhoid toxin disrupts the intestinal homeostasis. However, further research is required in order to elucidate the underlying mechanisms.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	1
Summary.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Καρκίνος	7
1.1.1 Ορισμός	7
1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	7
1.1.3 Παθογένεια του καρκίνου	11
1.1.4 Τα κυτταρικά και μοριακά χαρακτηριστικά του καρκίνου.....	18
1.2 Φλεγμονή	29
1.2.1 Ορισμός και χαρακτηριστικά της φλεγμονής.....	29
1.2.2 Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ)	30
1.3 Καρκίνος του παχέος εντέρου	33
1.3.1 Ορισμός και επιδημιολογικά δεδομένα.....	33
1.3.2 Μοριακή παθογένεση του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου	34
1.3.3 Σχέση IBD και καρκίνου του παχέος εντέρου.....	35
1.3.4 Ο ρόλος της ανοσίας και της φλεγμονής στην προαγωγή του καρκίνου	37
1.3.5 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ είναι κύριος ρυθμιστής της φλεγμονής. Ο ρόλος του στον καρκίνο.	40
1.3.6 Ο ρόλος της μικροχλωρίδας του εντέρου στην ανάπτυξη του καρκίνου	41
1.4 Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας	45
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46
2.1 Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε.....	46
2.2 Τα διαγονιδιακά ποντίκια και ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε	47
2.3 Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.....	48
2.3.1 Η μέθοδος.....	48
2.3.2 Ιστολογική αξιολόγηση	49
2.4 Ανοσοϊστοχημία.....	50
2.4.1 Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας.....	50
2.4.2 Αντισώματα και συνθήκες επώασης.....	53
2.4.3 Μάρτυρες	54
2.4.4 Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης.....	54
2.5 Στατιστική επεξεργασία.....	56
2.6 Λήψη φωτογραφιών.....	57

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
3.1 Ιστολογική ανάλυση	58
3.2 Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα	61
3.2.1 γΗ2ΑΧ δείκτης ενεργοποίησης του DDR ως απόκριση σε δικλωνικές θραύσεις..	61
3.2.2 p65/ NF-κΒ	73
3.2.3 CD3 και B220/CD45R (Δείκτες Τ και Β λεμφοκυττάρων αντίστοιχα)	83
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

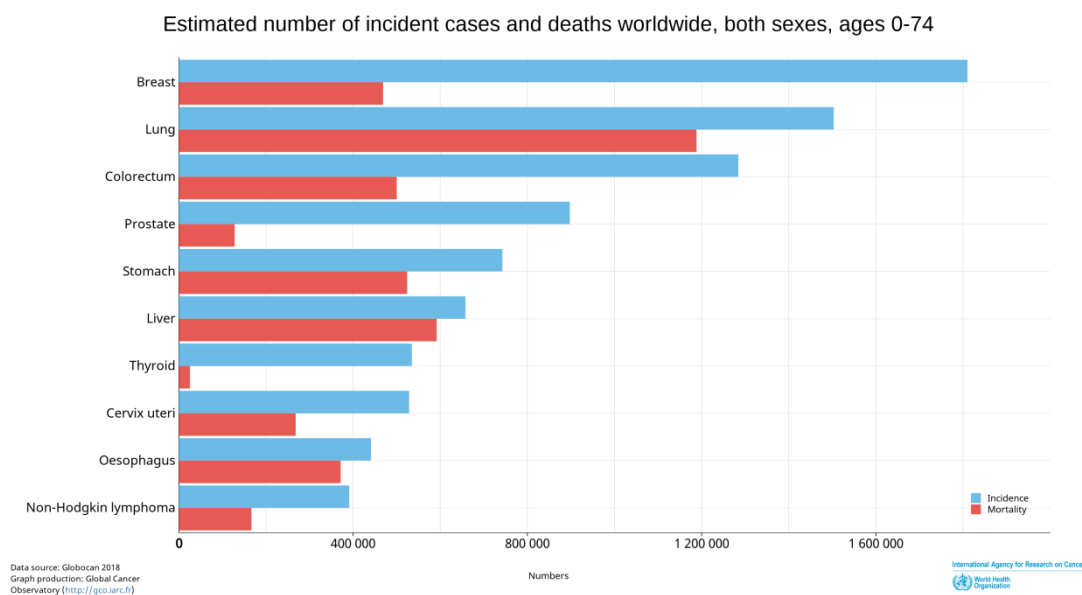
1.1.1 Ορισμός

Ο καρκίνος αποτελεί ένα σύνολο διακριτών γενετικών νοσημάτων με κύριο γνώρισμα τη δυνατότητα διήθησης των παρακείμενων ιστών ή και τη δημιουργία μεταστάσεων σε απομακρυσμένους ιστούς. Η δυνατότητα διήθησης και μετάστασης είναι αυτή η οποία διαφοροποιεί τους κακοήθεις από τους καλοήθεις όγκους (Luo et al., 2009).

Οι όγκοι, καλοήθεις και κακοήθεις, δε συνιστούν απλά απομονωμένες μάζες νεοπλασματικών κυττάρων που διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Είναι πολύπλοκοι ιστοί και αποτελούνται από διάφορα είδη κυττάρων, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Παράλληλα, τα κύτταρα του στρώματος (δηλαδή κύτταρα της φυσικής ή προσαρμοστικής ανοσίας που στρατολογούνται, κύτταρα που δημιουργούν τον ινώδη συνδετικό ιστό και κύτταρα των αγγείων), αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του όγκου και συμβάλλουν στην ανάπτυξη και στη στήριξή του. Το στρώμα, μαζί με το λεγόμενο «μικροπεριβάλλον του όγκου» συνδράμουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης (Hanahan και Weinberg, 2011).

1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία

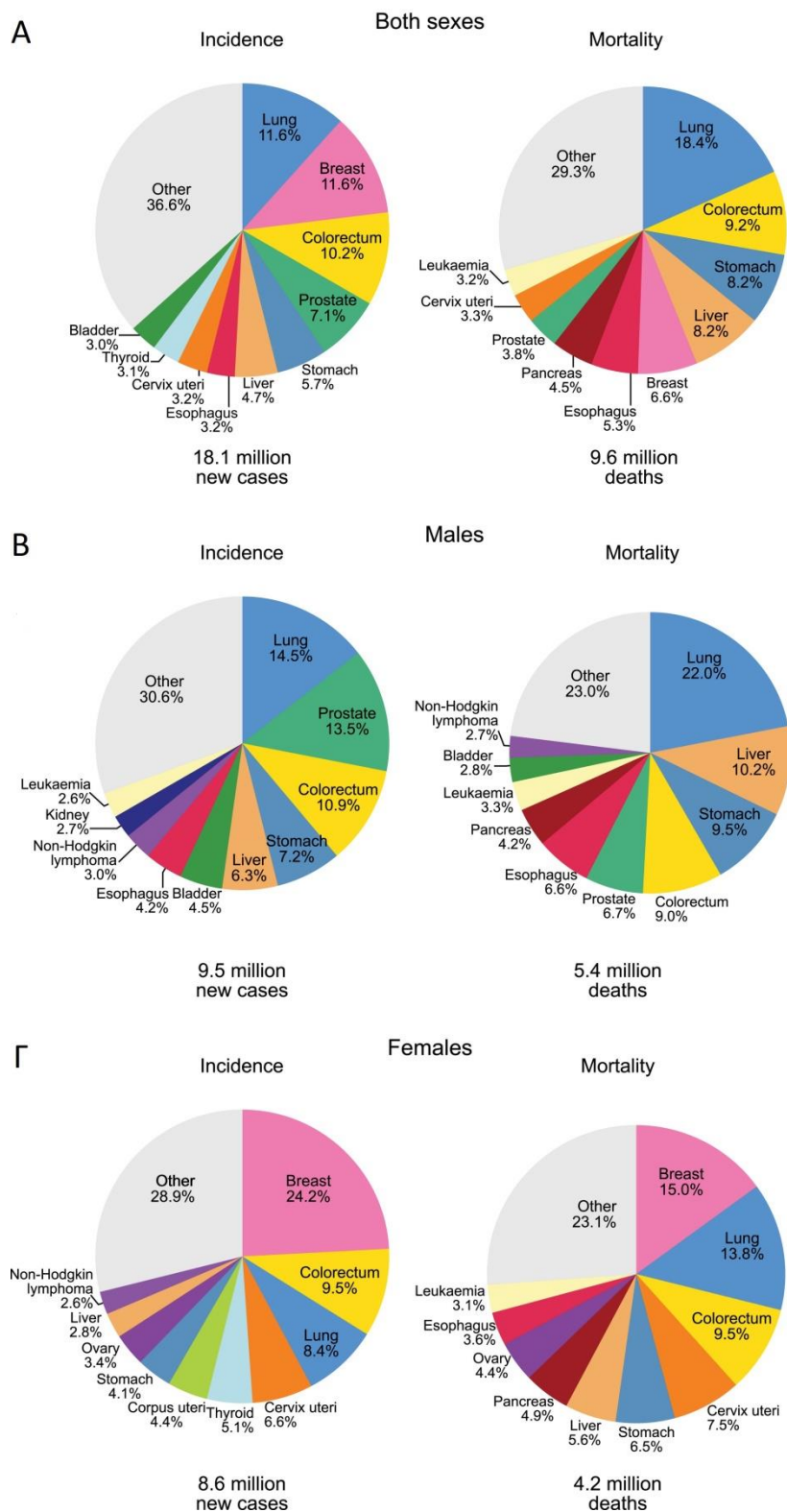
Ο καρκίνος αποτελεί μία δυνητικά θανατηφόρο νόσο. Σύμφωνα με τα επικαιροποιημένα στοιχεία του IARC (International Agency for Research on Cancer), η επίπτωση του καρκίνου για το έτος 2018 εκτιμάται σε 18,1 εκατομμύρια νέα περιστατικά, ενώ η θνησιμότητα του καρκίνου υπολογίζεται σε 9,6 εκατομμύρια νέους θανάτους παγκοσμίως (εξαιρούνται οι περιπτώσεις μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος) (Bray et al., 2018). Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη κυριότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα, σε άτομα κάτω των 70 ετών και συγκεκριμένα σε 91 από τις 172 χώρες του κόσμου (**Εικόνα 1**). Τα στοιχεία αυτά προκύπτουν από τις εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) το 2015 (Hassanpour και Dehghani, 2017). Οι κακοήθειες προσβάλλουν όλες τις ηλικίες, αν και η επίπτωσή τους φαίνεται να αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας (Anisimov et al., 2009).



Εικόνα 1. Εκτίμηση επίπτωσης και θνησιμότητας του καρκίνου για το 2018 παγκοσμίως . Πηγή IARC.

Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζεται αναλυτικά η εκτίμηση για την επίπτωση και τη θνησιμότητα των 10 κυριότερων τύπων καρκίνου παγκοσμίως το 2018, για τα δύο φύλα. Οι περισσότεροι καρκίνοι προσβάλλουν συχνότερα τους άνδρες, το οποίο σε αρκετές περιπτώσεις αντανakλά την μεγαλύτερη έκθεση των ανδρών σε παράγοντες κινδύνου. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν καρκίνοι με μεγαλύτερη επίπτωση στο ένα φύλλο σε σχέση με το άλλο χωρίς να μπορεί να δοθεί ακόμα κάποια εξήγηση. Το μελάνωμα εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες, ενώ το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα συχνότερα στους άνδρες. Όσον αφορά στις γεωγραφικές διαφορές στη συχνότητα των καρκίνων, μεγάλες διακυμάνσεις παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων περιοχών αντανakλώντας τη διαφορετικότητα στην έκθεση στους ίδιους ή ξεχωριστούς παράγοντες κινδύνου.

Συνολικά, οι δέκα κορυφαίοι τύποι καρκίνου αντιπροσωπεύουν πάνω από το 65% των πρόσφατα διαγνωσμένων περιπτώσεων καρκίνου και θανάτων. Ειδικότερα στους άντρες, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τον τύπο καρκίνου που διαγιγνώσκεται συχνότερα, αλλά και την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Ακολουθούν ο καρκίνος του προστάτη κι ο καρκίνος του παχέος εντέρου όσον αφορά στην επίπτωση, και ο καρκίνος του ήπατος και του στομάχου, αναφορικά με τη θνησιμότητα από καρκίνο στους άντρες (Bray et al., 2018).



Εικόνα 2. Διαγραμματική απεικόνιση της επίπτωσης και της θνησιμότητας των 10 κυριότερων τύπων καρκίνου το 2018 για (Α) και τα 2 φύλα, (Β) άντρες, (Γ) γυναίκες. Οι μη μελανωματικοί καρκίνοι του δέρματος περιλαμβάνονται στην κατηγορία "άλλοι". Πηγή: GLOBOCAN 2018.

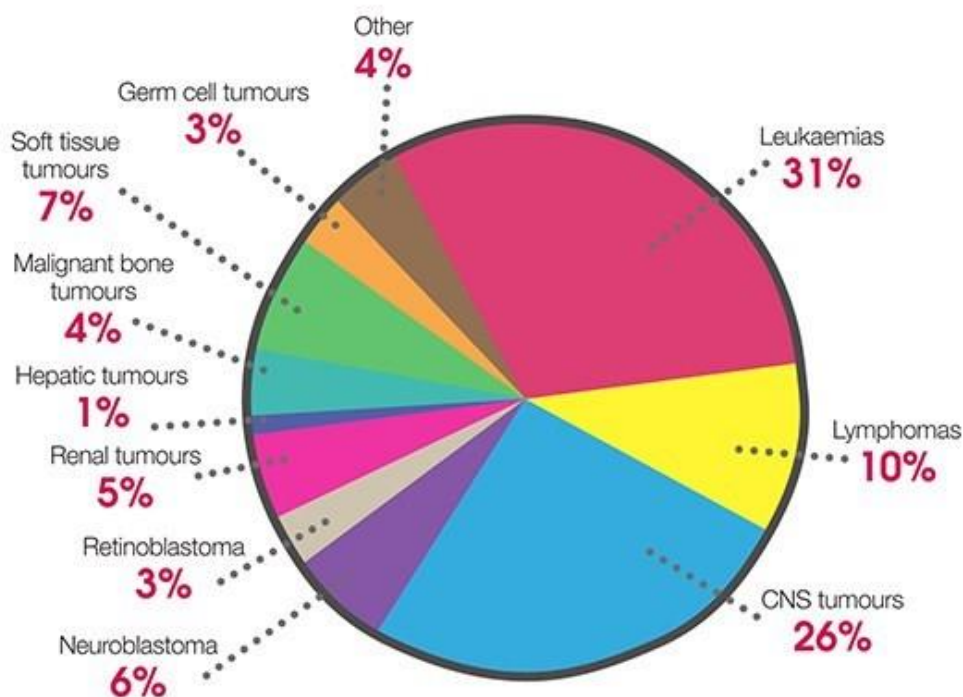
Στις γυναίκες, ο καρκίνος του μαστού είναι ο κύριος τύπου καρκίνου που διαγιγνώσκεται, αλλά και ο πιο θανατηφόρος. Ακολουθούν ο καρκίνος του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας κατατάσσεται τέταρτος αναφορικά με την επίπτωση και τη θνησιμότητα (Bray et al., 2018).

Με τον όρο «παιδικός ή παιδιατρικός καρκίνος» αναφερόμαστε σε περιστατικά καρκίνου που εμφανίζονται σε ηλικίες μικρότερες των 18 ετών. Οι παιδικοί καρκίνοι είναι σπάνιοι και αντιπροσωπεύουν ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 0,5% έως 4,6% του συνόλου των καρκίνων. Οι συχνότερες κακοήθειες (**Εικόνα 3**) είναι οι λευχαιμίες (το ένα τρίτο όλων των παιδικών καρκίνων), τα λεμφώματα, τα σαρκώματα και οι όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επιπλέον, υπάρχουν κάποιοι τύποι νεοπλασίας που εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε παιδιά, όπως το νευροβλάστωμα, το νεφροβλάστωμα, το μυελοβλάστωμα και το ρετινοβλάστωμα (Hewitt et al., 2003).

Main types of childhood cancer: children aged 0-14 years

United Kingdom 2001 to 2010

Based on data provided by National Registry of Childhood Tumours

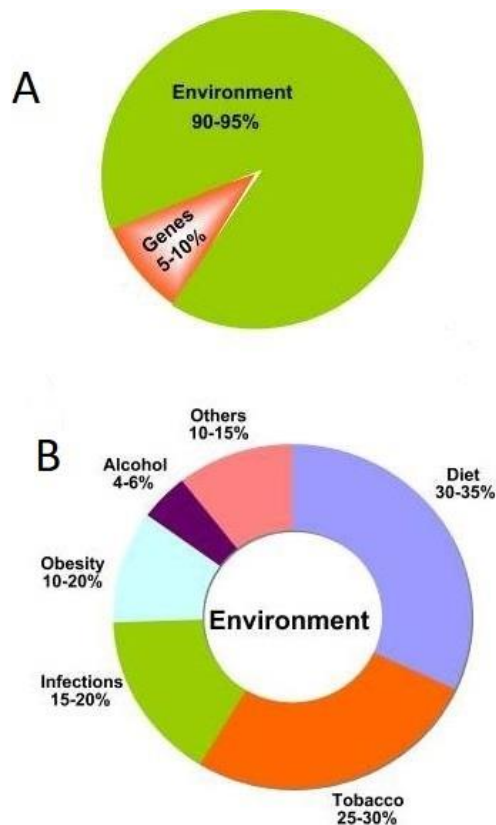


Εικόνα 3. Οι κυριότεροι τύποι παιδικού καρκίνου κατά την περίοδο 2001-2010 στο Ηνωμένο Βασίλειο. Πηγή: National Registry of Childhood Tumours.

1.1.3 Παθογένεια του καρκίνου

Η ογκογένεση είναι μια χρονοβόρα διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει γενετικές (κληρονομικές και επίκτητες) και επιγενετικές αλλοιώσεις. Πολύπλοκοι παθογενετικοί μηχανισμοί χαρακτηρίζουν συνεπώς τον καρκίνο, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να διευκρινιστεί με σαφήνεια η αιτιολογία, παρά μόνο να υποτεθεί συνηθέστερα η επίδραση κάποιων παραγόντων κινδύνου και η γενετική προδιάθεση.

1.1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου



Εικόνα 4. Ο ρόλος των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη του καρκίνου. (Α) Το % ποσοστό της συμβολής των γενετικών και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη του καρκίνου. (Β) Το % ποσοστό της συμβολής των περιβαλλοντικών παραγόντων στη θνησιμότητα του καρκίνου. Τροποποιημένο από: (Anand et al., 2008).

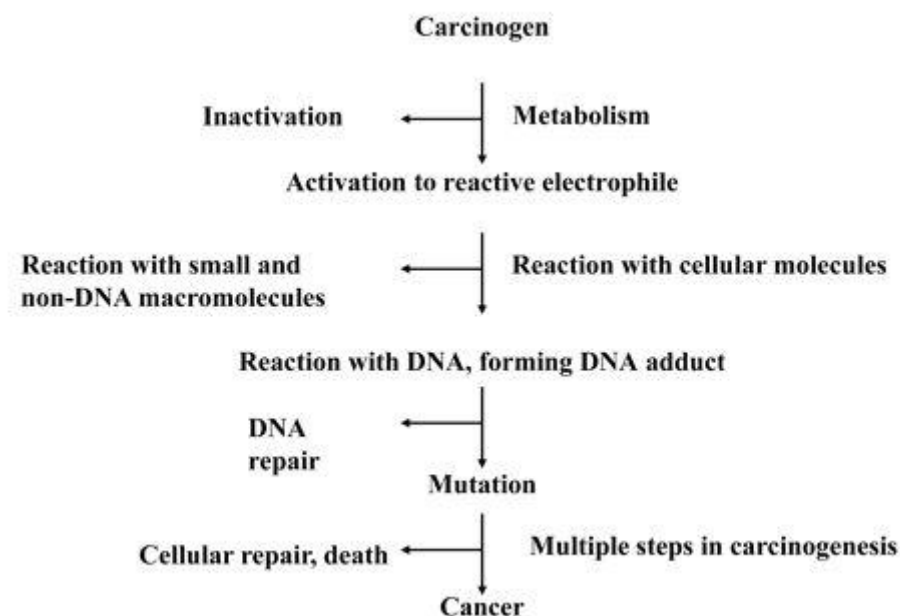
Η συμβολή του τρόπου ζωής στην ανάπτυξη του καρκίνου έχει αποδειχθεί μέσω μελετών σε μονοζυγωτικούς διδύμους. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, μόνο το 5-10% του συνόλου των καρκίνων οφείλεται σε κληρονομούμενη γονιδιακή βλάβη. Παρ' όλο που ο

καρκίνος προκύπτει ως αποτέλεσμα συσσώρευσης πολλαπλών μεταλλαγών, αυτές οι μεταλλαγές οφείλονται στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (Anand et al., 2008). Οι κυριότεροι και περισσότερο μελετημένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.

➤ **Χημικές ουσίες**

Υπάρχουν δύο τύποι χημικών καρκινογόνων, τα γενotoξικά και τα μη γενotoξικά ή επιγενετικά καρκινογόνα. Τα γενotoξικά καρκινογόνα δρουν δημιουργώντας σύμπλοκα με το DNA και προκαλούν βλάβες. Περιέχουν ηλεκτρονιόφιλα μόρια ή μετατρέπονται σε ηλεκτρονιόφιλα ενεργά μόρια. Οι αλλοιώσεις στο DNA είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ των πυρηνόφιλων κέντρων του DNA (άτομα αζώτου και οξυγόνου των νουκλεοτιδίων, άτομα οξυγόνου των φωσφορικών) και των ηλεκτρονιόφιλων μορίων των καρκινογόνων. Συνήθως είναι οργανικές ουσίες, φυσικές ή συνθετικές.

Τα επιγενετικά καρκινογόνα, από την άλλη, δρουν έμμεσα (δεν αντιδρούν με το DNA), οδηγώντας τα κύτταρα σε νεοπλασματικό μετασχηματισμό και πρόκειται για συνθετικά εντομοκτόνα, προσθετικές ουσίες στα τρόφιμα, χημειοθεραπευτικά φάρμακα κ.α. Μακροχρόνια έκθεση και σε υψηλές συγκεντρώσεις απαιτείται για την εμφάνιση καρκίνου.



Εικόνα 5. Μηχανισμός δράσης χημικών καρκινογόνων ουσιών. Πηγή: (Cohen και Arnold, 2011).

Το κάπνισμα είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο και υπολογίζεται ότι ευθύνεται για το 96% των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα. Παρά το γεγονός ότι ο κίνδυνος για καρκίνο μειώνεται μετά τη διακοπή του καπνίσματος, δεν ελαχιστοποιείται. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πάνω από 70 χημικές ουσίες, οι οποίες είναι γνωστό ότι προκαλούν καρκίνο, όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, νιτροζαμίνες κ.α (Hecht, 2003).

Ο κατάλογος των χημικών καρκινογόνων εμπλουτίζεται διαρκώς, μετά την εντατικοποίηση της έρευνας στον καρκίνο τα τελευταία χρόνια. Το IARC προειδοποιεί για το καρκινογόνο δυναμικό των παρακάτω χημικών ουσιών: αρωματικές αμίνες, αντινεοπλασματικά φάρμακα, αρωματικοί υδρογονάνθρακες, μέταλλα (αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο κ.α.) παραφίνες και φυσικά καρκινογόνα (πχ. αφλατοξίνη) (Cohen και Arnold, 2011).

➤ **Βιολογικοί παράγοντες**

Οι χρόνιες λοιμώξεις από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (ιούς, βακτήρια, παράσιτα) αυξάνουν τον κίνδυνο μετέπειτα ανάπτυξης καρκίνου. Υπολογίζεται πως οι ογκογόνοι ιοί είναι υπεύθυνοι για το 16% περίπου των νεοπλασιών σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV- human papilloma virus) και ειδικότερα οι τύποι HPV-16 και HPV-18, αλλά και ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) είναι οι συχνότεροι ογκογόνοι DNA ιοί. Οι δύο αυτοί ιοί ασκούν την καρκινογόνο δράση τους με διαφορετικό τρόπο. Ο HPV-16 είναι άμεσα μεταλλαξογόνος μέσω των E6 και E7 ιικών γονιδίων, ενώ ο HBV είναι δυνατόν να οδηγήσει στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, δρώντας έμμεσα, με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS- reactive oxygen species), μέσω της επαγωγής και εγκαθίδρυσης χρόνιας φλεγμονής. Ο ιός EBV (Epstein-Barr Virus) έχει συσχετισθεί με την ασθένεια του Hodgkin, με το μη-Hodgkin λέμφωμα, το λέμφωμα Burkitt, αλλά και με το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα. Επιπλέον, το σάρκωμα Kaposi έχει συσχετισθεί με τον HIV και τον KSHV (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus) (Irigaray et al., 2007).

Στους γνωστούς ογκογόνους RNA ιούς συμπεριλαμβάνονται ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) κι ο HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus type 1). Ο πρώτος προκαλεί οξειδωτικό στρες στα μολυσμένα κύτταρα κατά τη χρόνια φλεγμονή, ενώ ο δεύτερος είναι απευθείας μεταλλαξογόνος.

Εκτός από τους ογκογόνους ιούς, κάποια παράσιτα (όπως το *Schistosoma haematobium*) και κάποια βακτήρια με γνωστότερο το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), μπορούν να δράσουν άμεσα ως καρκινογόνα ή έμμεσα ως συμπαραγόντες ή ενεργοποιητές των καρκινογόνων (Irigaray et al., 2007; Anand et al., 2008).

➤ Ακτινοβολίες

Περισσότερο από 10% των διηθητικών καρκίνων (κάποιες λευχαιμίες και λεμφώματα, καρκίνος του θυρεοειδούς, καρκίνος του δέρματος, σάρκωμα, καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού) σχετίζονται με την έκθεση σε ιονίζουσα ή μη-ιονίζουσα ακτινοβολία. Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου, ως αποτέλεσμα δράσης των ακτινοβολιών, είναι δοσοεξαρτώμενη, όχι όμως και η σοβαρότητα των κλινικών εκδηλώσεων. Το ραδόνιο, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Η υψηλής ενέργειας ακτινοβολία (όπως ακτίνες X και γ, σωματίδια α και β, νετρόνια) προκαλεί βλάβες στο DNA. Η χρήση ακτινοβολιών στη διάγνωση και στη θεραπεία δύναται επίσης να προκαλέσει βλάβες στο DNA, όμως τα οφέλη αντισταθμίζουν τον κίνδυνο. Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση κακοηθειών του δέρματος. Τέλος, αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης παιδικής λευχαιμίας, καρκίνου του μαστού και όγκων στον εγκέφαλο, έχει αποδοθεί στην επίδραση ηλεκτρομαγνητικών πεδίων χαμηλής συχνότητας (Gilbert, 2009; Irigaray et al., 2007).

➤ Δίαιτα και παχυσαρκία

Κάποιες διατροφικές συνήθειες και η παχυσαρκία φαίνεται να σχετίζονται με ένα 30 - 35% περίπου της θνησιμότητας λόγω καρκίνου. Το αλκοόλ έχει χαρακτηριστεί ως καρκινογόνο από τον IARC και αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες, καρκίνο του παχέος εντέρου, ηπατοκυτταρικού καρκίνου, καρκίνου του στομάχου, του στόματος κ.α (Voigt, 2005; Cho et al., 2004; Seitz et al., 2012; Wicki και Hagmann, 2011).

Δίαιτες με αυξημένη περιεκτικότητα σε λιπαρά οδηγούν σταδιακά στην παχυσαρκία κι αυξάνουν τον κίνδυνο προσβολής από καρκίνο του μαστού, παχέος εντέρου, προστάτη και

πνεύμονα, ενώ αντίθετα δίαιτες πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά ασκούν προστατευτική δράση (Donaldson, 2004).

1.1.3.2 Γενετικοί παράγοντες- οικογενείς καρκίνοι

Όπως προαναφέρθηκε, ένα πολύ μικρό ποσοστό (της τάξης του 5-10%) των καρκίνων οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων που κληρονομούνται από γενιά σε γενιά. Τα πάσχοντα άτομα χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και μάλιστα σε μικρότερη ηλικία. Φέρουν συνήθως μετάλλαξη στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα ενός γονιδίου, το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (πχ. ογκοκατασταλτικό γονίδιο) ή συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA (πχ. MSH1). Απώλεια ετεροζυγωτίας σε μετέπειτα στάδιο, λόγω επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων κτλ, οδηγεί σύμφωνα με την υπόθεση Knudson σε ογκογένεση (Knudson, 1971; Rahner και Steinke, 2008).

Σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια των οποίων η απώλεια είναι καθοριστική για την εμφάνιση οικογενούς κακοήθειας είναι τα *BRCAI* και *BRCAII* στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, το *Rb* στην περίπτωση του ρετινοβλαστώματος, το *MSH1*, *MSH2* στον μη πολυποδιακό καρκίνο του ορθού, το *RET* στον καρκίνο του θυρεοειδούς και το *WT* στον όγκο Wilm.

Η πλειοψηφία των οικογενών καρκίνων κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και οι πρώτου βαθμού συγγενείς έχουν 50% πιθανότητα να φέρουν το μεταλλαγμένο γονίδιο. Κάποιοι από τους υπόλοιπους οικογενείς τύπους κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, ενώ υπάρχουν και μορφές που δεν ακολουθούν κανένα γνωστό πρότυπο μενδελιανής κληρονόμησης (Rahner και Steinke, 2008; Colas et al., 2012; Knudson, 1971).

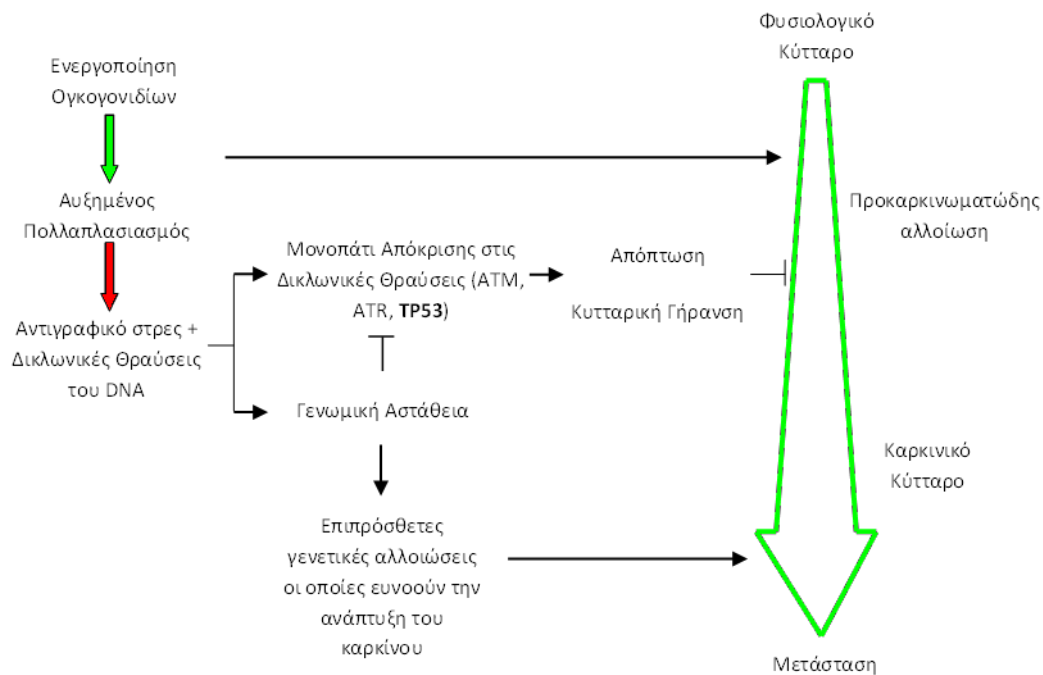
1.1.3.3 Καρκινογένεση

Ο τεράστιος όγκος πληροφοριών που έχει η επιστημονική κοινότητα μέσω των genome-wide αναλύσεων σε καρκινικά κύτταρα, διασαφήνισε το ρόλο των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στον καρκίνο. Η εναρκτήριος βλάβη (ή μεταλλαγή) μπορεί να προέλθει είτε από έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, είτε μπορεί να κληρονομήθηκε ή να συνέβη τυχαία κι αυθόρμητα. Αυτές οι πρωταρχικές βλάβες (που οδηγούν στην καρκινογένεση) έχει δειχθεί ότι συμβαίνουν σε ρυθμιστικά φυσιολογικά

γονίδια των εξής τεσσάρων κατηγοριών: πρωτοογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, γονίδια που ρυθμίζουν τη διαδικασία της απόπτωσης και γονίδια που ρυθμίζουν τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς βλαβών του DNA (Kumar et al., 2014).

Τα πρωτοογκογονίδια ρυθμίζουν φυσιολογικά την αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προϊόντα των γονιδίων αυτών είναι κινάσες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, μεταγραφικοί παράγοντες. Ενεργοποίηση ή υπερέκφραση κάποιου ογκογονιδίου (πχ. Ras) ή και απώλεια κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου (πχ. Rb, p53) οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, αντιθέτως, αναστέλλουν την ανάπτυξη κωδικοποιώντας πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην αναστολή της αύξησης και του πολλαπλασιασμού. Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να οφείλεται σε γονιδιακές μεταλλάξεις όπως αντικατάσταση, προσθήκη ή έλλειψη βάσης/βάσεων, ή σε έλλειψη ολόκληρου γονιδίου, καθώς και σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως μετατόπιση ή αναστροφή. Επίσης, επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να προάγουν τη γονιδιακή δραστηριότητα μέσω ακετυλίωσης των ιστονών ή να αναστέλλουν τη γονιδιακή δραστηριότητα μέσω αποακετυλίωσης των ιστονών ή μεθυλίωσης του DNA (Kumar et al., 2014; Hassanpour και Dehghani, 2017).

Επίσης, έχει προταθεί πως σε πρώιμα στάδια στη διαδικασία της καρκινογένεσης συμβαίνουν διαταραχές στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, οδηγώντας σε γενωμική αστάθεια και περαιτέρω συσσώρευση γενετικών βλαβών. Το μοντέλο των «προκαλούμενων μέσω ογκογονιδίων βλαβών στο DNA», μπορεί να ερμηνεύσει τα δύο ανωτέρω κοινά χαρακτηριστικά των κακοήθων όγκων, ρίχνοντας φως από τα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης μέχρι την απόκτηση από το εν δυνάμει καρκινικό κύτταρο του πλήρους καρκινικού φαινοτύπου (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Το μοντέλο της επαγόμενης από ογκογονίδιο βλάβης στο DNA για την ανάπτυξη του καρκίνου. Τροποποίηση από: (Halazonetis et al., 2008).

Η ενεργοποίηση γονιδίων που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μπορεί να οδηγήσει σε αντιγραφικό στρες (κατάρρευση της αντιγραφικής διχάλας), με αποτέλεσμα την πρόκληση δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Το πρωτεϊνικό συμπλόκο MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) λειτουργεί ως αισθητήρας στο μονοπάτι απόκρισης στη βλάβη (DDR), αναγνωρίζοντας την ύπαρξη δίκλωνικής θραύσης (DSB, double strand break) και μεταβαίνει στο σημείο της θραύσης. Η κινάση ATM (Ataxia Telangiectasia mutated) αυτοφωσφορυλιώνεται στη Ser1981 κι ενεργοποιείται κατά αυτόν τον τρόπο. Η ενεργοποιημένη πλέον κινάση pATM προσελκύεται στην περιοχή που έχει δημιουργηθεί δίκλωνική θραύση μέσω της αλληλεπίδρασής της με το σύμπλοκο MRN και φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα όπως: την ιστόνη H2AX στη Ser139 (γH2AX), πρωτεΐνες όπως 53BP1, MDC1 ή BRCA1 (οι οποίες συμβάλλουν στη συγκρότηση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων στα σημεία των DSBs και προάγουν τη φωσφορυλίωση άλλων υποστρωμάτων από την ATM). Επιπλέον η pATM φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση-τελεστή Chk2 στην Thr68 και η τελευταία με τη σειρά της όταν ενεργοποιηθεί φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TP53 στη Ser20. Επιπλέον, η pATM φωσφορυλιώνει απευθείας την πρωτεΐνη TP53 στη Ser15. Η φωσφορυλίωση της TP53 στις συγκεκριμένες θέσεις, τη σταθεροποιεί, αυξάνοντας το χρόνο ημίσειας ζωής της. Το τελευταίο έχει ως

συνέπεια το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου με σκοπό την επιδιόρθωση της βλάβης. Αν για κάποιο λόγο η βλάβη δεν επιδιορθωθεί, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση ή γήρανση. Ως εκ τούτου, η άθροιση των ακόλουθων παραγόντων: α) γH2AX (φωσφορυλιωμένη μορφή της H2AX στη Σερίνη 139), β) pATM (φωσφορυλιωμένη μορφή της ATM στη σερίνη 1981) και γ) η δημιουργία 53BP1 foci αντανακλούν την ενεργοποίηση του DDR λόγω της παρουσίας δικλωνικών θραύσεων στο DNA και αποτελούν καθιερωμένους βιοδείκτες (Delia και Mizutani, 2017; Bartkova, Hořejší, et al., 2005; Bartkova, Bakkenist, et al., 2005).

Όπως προαναφέρθηκε, οι δικλωνικές θραύσεις του DNA οδηγούν στην επαγωγή του μοριακού μονοπατιού απόκρισης σε βλάβη του DNA, με τελικό τελεστή την πρωτεΐνη TP53, η οποία κινητοποιεί τους δύο σημαντικούς αντι-ογκογόνους φραγμούς: την κυτταρική γήρανση και την απόπτωση. Όμως, η διαρκής δράση των ογκογόνων σημάτων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση γενωμικής αστάθειας, καθώς και την εμφάνιση μεταλλάξεων στη πρωτεΐνη TP53. Ειδικά η απώλεια της φυσιολογικής δράσης της TP53 συμβάλλει στην κατάρρευση των δύο προστατευτικών μηχανισμών έναντι στην καρκινογένεση, δηλαδή της απόπτωσης και της κυτταρικής γήρανσης. Επιπλέον, η γενωμική αστάθεια συμβάλλει στη συσσώρευση επιπρόσθετων γενετικών αλλοιώσεων, με αποτέλεσμα το κύτταρο να αποκτήσει σταδιακά έναν πλήρη καρκινικό φαινότυπο. Η γενωμική αστάθεια και η απώλεια των δύο αντι-ογκογόνων μηχανισμών παρατηρείται στην αρχή της γένεσης του καρκίνου (Halazonetis et al., 2008).

1.1.4 Τα κυτταρικά και μοριακά χαρακτηριστικά του καρκίνου

Οι Hanahan και Weinberg πρότειναν τα κύρια χαρακτηριστικά που είναι κοινά σε όλους τους τύπους καρκίνου, αποσκοπώντας στην κατανόηση της αξιοσημείωτης ποικιλομορφίας των νεοπλασματικών νόσων (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Τα κοινά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Τροποποίηση από: (Hanahan και Weinberg, 2011).

Καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα προοδευτικά εξελίσσονται σε νεοπλασματικά, αποκτούν διαδοχικά τα παρακάτω χαρακτηριστικά, τα οποία τους προσδίδουν την ικανότητα να αποκτήσουν ογκογόνο δυναμικό και να γίνουν τελικά κακοήγη (Hanahan και Weinberg, 2000; Hanahan και Weinberg, 2011). Τα κυτταρικά και μοριακά αυτά χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

➤ Αύξηση ανεξάρτητη από μιτογόνα ή αυξητικά ερεθίσματα

Υπό φυσιολογικές συνθήκες υφίσταται αυστηρή ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού, μέσω ρύθμισης της παραγωγής και της έκκρισης αυξητικών σημάτων, ώστε να διατηρείται η ομοιοστασία του αριθμού των κυττάρων, η αρχιτεκτονική και η φυσιολογική λειτουργία των ιστών. Τα σήματα αυτά είναι κυρίως αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι συνδέονται σε επιφανειακούς υποδοχείς με ενδοκυττάρια τμήματα με δράση κινάσης τυροσίνης. Μέσω της ενεργοποίησης κάποιων ογκογονιδίων (που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες ή διαμεμβρανικούς υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ή μόρια που συμμετέχουν στη μεταγωγή αυξητικών σημάτων), τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα διατήρησης σημάτων αύξησης και πολλαπλασιασμού είτε παράγοντας τα ίδια αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς

αυτών, με αποτέλεσμα την αυτοκρινή ενεργοποίησή τους, είτε διεγείροντας μέσω σηματοδότησης τα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα του στρώματος, ώστε να παράγουν αυξητικούς παράγοντες. Εναλλακτικά, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αυξάνουν τον αριθμό των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνειά τους, γεγονός που οδηγεί στην υπερευαίσθητοποίησή τους σε εξωκυττάρια αυξητικά σήματα (πχ. ο HER2/neu υπερεκφράζεται στο 25% των κακοηθειών του μαστού). Το ίδιο μπορεί να επιτευχθεί από τα καρκινικά κύτταρα μεταβάλλοντας τη δομή των υποδοχέων τους. Τέλος, η υπερέκφραση ή η διαρκής ενεργοποίηση ενός παράγοντα που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι αγωγής αυξητικών σημάτων συμβάλλει στην απεμπλοκή του καρκινικού κυττάρου από εξωκυττάρια αυξητικά σήματα προκειμένου να πολλαπλασιασθεί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη RAS, η οποία μεταλλάσσεται περίπου στο 20% των καρκίνων. Η μεταλλαγμένη αυτή μορφή της πρωτεΐνης RAS την καθιστά ενεργή για περισσότερο χρόνο, διατηρώντας επομένως για περισσότερο χρόνο ενεργό και το μονοπάτι αγωγής μιτογόνων σημάτων RAS/RAF/MAPK κινασών (Hanahan και Weinberg, 2011; Hanahan και Weinberg, 2000; Malumbres και Barbacid, 2003).

➤ Απευαίσθητοποίηση σε αντι-αυξητικά σήματα

Εκτός από την επαγωγή και διατήρηση σημάτων αύξησης και πολλαπλασιασμού, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να παρακάμπτουν τους μηχανισμούς αρνητικής ρύθμισης/καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι μηχανισμοί αυτοί φυσιολογικά ελέγχονται από ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα δύο πιο σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι το RB και το P53 και είναι κεντρικοί κόμβοι στην απόφαση του κυττάρου να πολλαπλασιασθεί ή εναλλακτικά να ενεργοποιήσει προγράμματα γήρανσης ή απόπτωσης (Hanahan και Weinberg, 2000; Hanahan και Weinberg, 2011).

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μεταφέρουν τα αντι-αυξητικά σήματα έχουν κατά βάση ως τελικό τελεστή την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb). Η Rb στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή βρίσκεται συνδεδεμένη με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1 και αποτρέπει τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, στη φωσφορυλιωμένη της μορφή ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1 απελευθερώνεται και προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Rb, προκαλούν την απενεργοποίησή της, με αποτέλεσμα την απώλεια ευαισθησίας του κυττάρου σε αντι-αυξητικά σήματα (Frolov και Dyson, 2004; Korenjak και Brehm, 2005).

Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος ανιχνεύει και μεταδίδει σήματα καταστολής της ανάπτυξης που προέρχονται από το εξωτερικό των κυττάρων, ενώ η πρωτεΐνη TP53 ανιχνεύει σήματα στρες ή ανωμαλιών στο εσωτερικό των κυττάρων, με τη βοήθεια πρωτεϊνών - «αισθητήρων» (Hanahan και Weinberg, 2011). Λεπτομέρειες για τον τρόπο δράσης της TP53 αναλύονται περαιτέρω στη συνέχεια.

➤ Αποφυγή του κυτταρικού θανάτου

Υπάρχουν δύο μορφές κυτταρικού θανάτου: η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) και η νέκρωση. Η ομοιοστασία των κυττάρων ενός ιστού διατηρείται μέσω ελέγχου του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Ο μηχανισμός της απόπτωσης αποτελείται από μόρια ρυθμιστές και μόρια τελεστές που έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κασπασών και τον κυτταρικό θάνατο. Υπάρχουν προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bax και Bak) και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w κ.α.) που ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2 και η ισορροπία αυτών των πρωτεϊνών καθορίζει τη μοίρα του κυττάρου (Hanahan και Weinberg, 2011).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 εντοπίζεται στη ζώνη p13.1 του χρωμοσώματος 17 και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 53kD. Η πρωτεΐνη TP53 είναι ένας μεταγραφικός πράγοντας με πολλές λειτουργίες. Ενεργοποιείται ως απόκριση σε διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις, όπως βλάβες στο DNA ή στη μιτωτική άτρακτο, ενεργοποίηση ογκογονιδίων και γενωμική αστάθεια, κόντεμα τελομερών, υποξία και μεταβολικό στρες. Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, τη φύση και τη βαρύτητα της στρεσογόνου κατάστασης, η P53 ενεργοποιεί καταρροϊκά μονοπάτια που οδηγούν είτε α) στο «πάγωμα» του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (ή G2), είτε β) στην απόπτωση, είτε γ) στην κυτταρική γήρανση. Άλλωστε, η πρωτεΐνη P53 έχει γνωστή προ-αποπτωτική δράση, μεταξύ άλλων. Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης στην απόπτωση. Δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι στο 50% περίπου του συνόλου των καρκίνων η πρωτεΐνη TP53 εντοπίζεται μεταλλαγμένη και στο 70% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου ανιχνεύεται ομόζυγη απώλεια του γονιδίου που την κωδικοποιεί (Aylon και Oren, 2011; Hickman et al., 2002).

Έχειδειχθεί πως ένας ακόμη κυτταρικός μηχανισμός, η αυτοφαγία, συμμετέχει στην επιβίωση αλλά και στο θάνατο του καρκινικού κυττάρου. Η αυτοφαγία λειτουργεί σε χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά ενεργοποιείται και σε καταστάσεις κυτταρικού στρες (όπως για παράδειγμα σε έλλειψη θρεπτικών). Η αυτοφαγία καθιστά

ικανά τα κύτταρα να καταβολίσουν κυτταρικά οργανίδια (πχ. ριβοσώματα, μιτοχόνδρια) με σκοπό την ανακύκλωση των καταβολιτών και την επιβίωση του κυττάρου.

Υπάρχει αλληλεπίδραση των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν την αυτοφαγία, την απόπτωση και την κυτταρική ομοιοστασία. Για παράδειγμα η σηματοδοτική οδός των κινασών PI3K, AKT, mTOR (η οποία ενεργοποιείται από σήματα επιβίωσης, ώστε να εμποδιστεί η απόπτωση) αναστέλλει την αυτοφαγία. Η αυτοφαγία επομένως είναι ένα ακόμα εμπόδιο που πρέπει να ξεπεράσουν τα καρκινικά κύτταρα κατά την εξέλιξη του όγκου. Κατά παράδοξο τρόπο όμως, η στέρηση θρεπτικών συστατικών, η ακτινοθεραπεία και τα κυτταροτοξικά φάρμακα μπορεί να οδηγήσουν σε αυτοφαγία με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αντινεοπλασματική δράση αυτών των στρεσογόνων καταστάσεων (Levine και Kroemer, 2008; Hanahan και Weinberg, 2011).

Σε αντίθεση με την απόπτωση όπου το κύτταρο συρρικνώνεται και αποδομείται από γειτονικά κύτταρα, τα νεκρωτικά κύτταρα διογκώνονται, διαρρηγνύονται και απελευθερώνονται έτσι τα κυτταρικά στοιχεία τους στο μικροπεριβάλλον του παρακείμενου ιστού. Η νέκρωση φαίνεται να είναι κάτω από γενετικό έλεγχο και όχι ένα τυχαίο γεγονός, όπως θεωρούνταν μέχρι πριν μερικά χρόνια. Επιπλέον, η νέκρωση έχει δυναμικό προαγωγής της φλεγμονής και της ανάπτυξης του όγκου, καθώς το νεκρωτικό κύτταρο εκκρίνει προφλεγμονώδη σήματα, με αποτέλεσμα την προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού δρουν προστατευτικά απομακρύνοντας τα νεκρωτικά υπολείμματα και προλαμβάνοντας μεγάλες ιστικές βλάβες. Παρ' όλα αυτά όμως, υπάρχουν ενδείξεις πως μπορούν να προάγουν την ογκογένεση μέσω της ικανότητάς τους για επαγωγή της αγγειογένεσης και επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της διεισδυτικότητας των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, φαίνεται πως τα καρκινικά κύτταρα ανέχονται τον νεκρωτικό θάνατο με σκοπό να εκμεταλλευτούν τα πλεονεκτήματα που τους παρέχει η προσέλκυση των φλεγμονωδών κυττάρων του ανοσοποιητικού (Hanahan και Weinberg, 2011).

➤ Ικανότητα ανέσου πολλαπλασιασμού - αθανатоποίηση κυττάρων

Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν πεπερασμένη ικανότητα κυτταρικών διαιρέσεων (όριο Hayflick). Ο λόγος είναι η βράχυνση των τελομερών σε κάθε κυτταρική διαίρεση, επειδή δε διαθέτουν το ένζυμο τελομεράση. Συνεπώς, μετά από έναν αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, η πρωτεΐνη P53 ενεργοποιείται και τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού, εισέρχονται στη φάση της αντιγραφικής γήρανσης ή και αποπίπτουν.

Η τελομεράση είναι το ένζυμο που αυξάνει το μέγεθος των τελομερών και απουσιάζει στα μη-αθανатоποιημένα κύτταρα. Τα βλαστικά, μόνο, κύτταρα διαθέτουν τελομεράση, ενώ τα καρκινικά την ενεργοποιούν με σκοπό την αντίσταση στην εμφάνιση γήρανσης και απόπτωσης, αλλά και την προώθηση της καρκινικής ανάπτυξης. Το 90% των καρκίνων εμφανίζουν ενεργοποιημένη την τελομεράση (Hanahan & Weinberg, 2000).

➤ Επαγωγή αγγειογένεσης

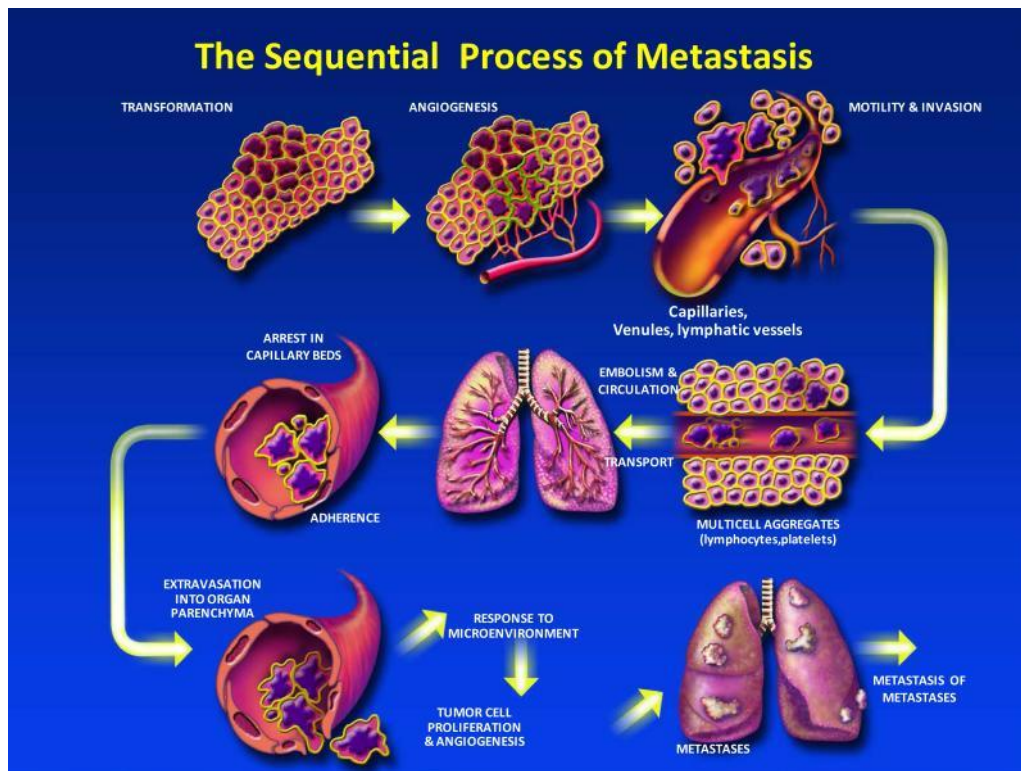
Η πρόσληψη θρεπτικών και οξυγόνου, αλλά και η απομάκρυνση μεταβολικών αποβλήτων και διοξειδίου του άνθρακα συνιστούν επιτακτική ανάγκη για τους όγκους, όπως και για τους φυσιολογικούς ιστούς. Οι ανάγκες αυτές εξυπηρετούνται μέσω της επαγωγής της αγγειογένεσης, η οποία ενεργοποιείται παθολογικά μέσω ενός «αγγειογενετικού διακόπτη». Οι παράγοντες, αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης (VEGF) και βασικός παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών (FGF) παράγονται από τα κακοήγη κύτταρα καθώς και από κύτταρα του στρώματος που βρίσκονται παρακείμενα στον όγκο, με αποτέλεσμα την επαγωγή της αγγειογένεσης.

Παραδόξως, η αγγειογένεση φαίνεται να ενεργοποιείται αρκετά νωρίς κατά την ογκογένεση και μάλιστα υπάρχουν αναφορές για την ενεργοποίησή της σε προκαρκινικές αλλοιώσεις, δυσπλασίες και *in situ* καρκινώματα. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως η TP53 παρουσιάζει αντι-αγγειογενετική δράση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι μεταλλάξεις στην TP53 είναι συχνές στις διάφορες μορφές καρκίνου, με συνέπεια να άρεται η ανασταλτική της δράση απέναντι στην αγγειογένεση.

Τα νεοαγγεία φαίνεται να έχουν αποκλίνουσα και ελαττωματική δομή σε σχέση με τα φυσιολογικά αγγεία. Υπάρχουν διαβαθμίσεις στην αγγειογένεση, μερικοί όγκοι είναι υποαγγειούμενοι, ενώ άλλοι όπως του καρκίνου του νεφρού είναι ιδιαίτερα αγγειογενετικοί. Τα νεοπλασματικά κύτταρα πρέπει να ξεπεράσουν το φραγμό των ενδογενών αναστολέων της αγγειογένεσης. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που προέρχονται από το μυελό των οστών, όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα και προγονικά μυελικά κύτταρα συνεισφέρουν στη διατήρηση της αγγειογένεσης, αλλά και στην προώθηση της διήθησης και μετάστασης. Τα κύτταρα αυτά διηθούν τους ιστούς με τις προκαρκινικές αλλοιώσεις (αλλά και τους αναπτυγμένους όγκους) και οργανώνονται περίξ των αλλοιώσεων αυτών (Kerbel, 2008; Hillen και Griffioen, 2007; Ferrara, Gerber, και LeCouter, 2003; Douglas Hanahan και Weinberg, 2011).

➤ Διήθηση και μετάσταση

Η διαδικασία της διήθησης και της μετάστασης (**Εικόνα 8**) λαμβάνει χώρα ως εξής: αρχικά παρατηρείται διήθηση του παρακείμενου ιστού από τα καρκινικά κύτταρα, μέσω αποκόλλησής τους από τα γειτονικά κύτταρα και λύση της βασικής μεμβράνης και μετακίνηση διαμέσου της εξωκυττάριας ουσίας. Σε δεύτερο στάδιο συμβαίνει εισχώρηση στη μεταστατική οδό (όπως αιματική οδό, λεμφική οδό) και διασπορά εντός της οδού. Στη συνέχεια, γίνεται έξοδος από τη μεταστατική οδό και τελικά εγκατάσταση, πολλαπλασιασμός, δημιουργία μεταστατικής εστίας και επαγωγή αγγειογένεσης στην απομακρυσμένη θέση (Talmadge και Fidler, 2010; Kumar et al., 2014).



Εικόνα 8. Τα στάδια της μετάστασης. Πηγή: (Talmadge και Fidler, 2010).

Η μετάσταση δεν είναι μία εύκολη διαδικασία. Δε διαθέτουν όλα τα καρκινικά κύτταρα, ανεξαιρέτως, το μεταστατικό δυναμικό. Επίσης, το καρκινικό κύτταρο θα πρέπει να είναι ικανό να επιβιώσει σε κάθε ένα από αυτά τα στάδια που αναφέρθηκαν παραπάνω και να αναπτύξει μηχανισμούς, ώστε να καταφέρει να προσαρμοστεί στις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος στο εκάστοτε σημείο μετάστασης (Chiang και Massagué, 2008).

Τα μόρια διακυτταρικής προσκόλλησης και τα μόρια που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων στη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία έχει αναγνωρισθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μετάστασης. Τέλος, αξιοσημείωτος είναι κι ο ρόλος του παρακείμενου στον όγκο στρώματος στο μηχανισμό της μετάστασης. Το στρώμα θεωρείται ότι ευοδώνει τη δράση των μεταστατικών κακοήθων κυττάρων (Fidler, 2003; Hanahan και Weinberg, 2011).

➤ Γενωμική αστάθεια και μεταλλαγή

Ο όρος γενωμική αστάθεια χαρακτηρίζει τις γενετικές αλλοιώσεις που συμβαίνουν από το επίπεδο του χρωμοσώματος μέχρι τις σημειακές μεταλλαγές. Σε επίπεδο χρωμοσώματος οι αλλοιώσεις μπορεί να είναι δομικές (όπως έλλειψη, μετάθεση) και αριθμητικές (ανεupλοειδία, πολυπλοειδία). Επιπλέον, η απώλεια των τελομερών και η διαταραχή στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA θεωρείται ότι συμμετέχουν στην πρόκληση γενωμικής αστάθειας. Μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης λάθους ζευγαρώματος βάσεων (hMLH1, hMSH2) προκαλούν μικροδορυφορική αστάθεια, κατά την οποία παρατηρούνται μεταβολές στον αριθμό των επαναλήψεων των μικροδορυφορικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, χωρίς ωστόσο να είναι απαραίτητη η ύπαρξη μεταλλάξεων στα ανωτέρω γονίδια προκειμένου να υπάρχει μικροδορυφορική αστάθεια. Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι οι προκαλούμενες μέσω ενεργοποίησης ογκογονιδίων δικλωνικές θραύσεις του DNA συμμετέχουν στην εμφάνιση γενωμικής αστάθειας (Halazonetis et al., 2008).

Η γενωμική αστάθεια είναι χαρακτηριστικό όλων των μορφών καρκίνου. Γενωμική αστάθεια παρατηρείται ήδη από τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης, πριν την εμφάνιση του πλήρους καρκινικού φαινοτύπου (Gorgoulis et al. 2005). Στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε η παρουσία γενωμικής αστάθειας σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, οι οποίες είναι ευπαθείς στην εμφάνιση δικλωνικών θραύσεων μετά από διαταραχές στο μηχανισμό της αντιγραφής του DNA (common fragile sites), σε υπερπλασία (επαγόμενη από τη χορήγηση αυξητικών παραγόντων) προερχόμενη από δέρμα ανθρώπινου ξενομοσχεύματος, χωρίς ωστόσο να υπάρχει απώλεια τελομερών. Η εμφάνιση γενωμικής αστάθειας από τα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης πιθανόν συμβάλλει στην απόκτηση εκείνων των ιδιοτήτων που μετατρέπουν ένα κύτταρο σε καρκινικό. Αυτό συμβαίνει διότι τα καρκινικά κύτταρα μέσω της γενωμικής αστάθειας μπορούν να αποκτήσουν αυξημένη ευαισθησία σε μεταλλαξογόνους παράγοντες, καθώς

και να ξεπεράσουν το φραγμό της γήρανσης ή της απόπτωσης, με τη διατάραξη των μηχανισμών επόπτευσης και συγκεκριμένα της TP53 (Gorgoulis et al., 2005).

➤ Διαφυγή της ανοσοεπιτήρησης- ανοσοδιαφυγή

Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της βιολογίας του όγκου. Έχει την ικανότητα να προωθεί ή να αναστέλλει τη δημιουργία, την αύξηση, τη διήθηση και τη μετάσταση των όγκων.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα του ανοσοποιητικού επιτηρούν τους ιστούς (ανοσοεπιτήρηση- immune surveillance) για διάφορα αντιγόνα και τα καταστρέφουν. Κατά το πρώτο, λοιπόν, αυτό στάδιο της εξάλειψης (elimination phase), κύτταρα της φυσικής ανοσίας αναγνωρίζουν την ύπαρξη αναπτυσσόμενου όγκου. Με την επαγωγή φλεγμονωδών σημάτων, στρατολογούνται δραστικά κύτταρα, αναγνωρίζουν τα καρκινικά αντιγόνα, εξαλείφουν τα καρκινικά κύτταρα και εκκρίνουν χημειοκίνες που αναστέλλουν την αγγειογένεση. Στη συνέχεια, δενδριτικά κύτταρα μεταναστεύουν στους γειτονικούς λεμφαδένες και μέσω της αντιγονοπαρουσίασης, στρατολογούν περαιτέρω ανοσιακά κύτταρα. Στο τρίτο στάδιο, NK κύτταρα και μακροφάγα αλληλοενεργοποιούνται μέσω της παραγωγής IFN- γ και IL-12 και προάγεται κατά αυτόν τον τρόπο η καταστροφή καρκινικών κυττάρων μέσω απόπτωσης. Στους λεμφαδένες δενδριτικά κύτταρα-εξειδικευμένα για τον όγκο επάγουν τη διαφοροποίηση Th1 κυττάρων και τα τελευταία επάγουν την ανάπτυξη κυτταροτοξικών CD8⁺ κυττάρων. Στο τελευταίο στάδιο, CD4⁺ και CD8⁺ ειδικά για τον όγκο λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στην περιοχή του όγκου και τον καταστρέφουν.

Όμως, υπάρχουν όγκοι χαμηλής αντιγονικότητας, αλλά και καρκινικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να διαφεύγουν της ανοσοεπιτήρησης. Ακολουθεί μια μακρά συνήθως χρονική περίοδος (equilibrium) στη διάρκεια της οποίας αυτά τα κύτταρα του όγκου επιβιώνουν και σταδιακά, μέσω εξέλιξης και φυσικής επιλογής, προκύπτουν νεοπλασματικά κύτταρα με νέες γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες αυξάνουν περαιτέρω την αντίσταση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Στο στάδιο αυτό της ανοσοδιαφυγής, τα κύτταρα του όγκου μπορούν να διαφεύγουν της ανοσιακής απάντησης μέσω της υιοθέτησης των εξής μηχανισμών:

- Χαμηλή έκφραση ή απώλεια MHC I
- Μεταλλάξεις στο MHC I που έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία αντιγονοπαρουσίασης

- Μη παροχή συνδιεγερτικών μορίων
- Παραγωγή ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών
- Επεξεργασία των καρκινικών αντιγόνων (antigen editing)
- Έκφραση Fas-FasL με συνέπεια την επαγωγή απόπτωσης των T κυττάρων
- Μη λειτουργικότητα των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο
- Διήθηση του όγκου με T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) ή MDSCs που προάγουν την ανοσοκαταστολή
- Έκφραση μεταγραφικών παραγόντων (πχ. STAT3 που αυξάνει την παραγωγή IL-6, η οποία επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών και μειώνει την ενεργότητα των Th1 κυττάρων) (Kim et al., 2007; Dunn et al., 2004; Beatty και Gladney, 2015; Hanahan και Weinberg, 2011).

➤ Προαγωγή της ογκογένεσης μέσω της φλεγμονής

Η φλεγμονή παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου με διάφορους μηχανισμούς:

α) τροφοδότηση του μικροπεριβάλλοντος με διάφορους βιολογικούς παράγοντες όπως παράγοντες ανάπτυξης που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παράγοντες επιβίωσης που περιορίζουν τον κυτταρικό θάνατο, αγγειογενετικούς παράγοντες, ένζυμα που διαφοροποιούν τον εξωκυττάριο χώρο, σήματα που οδηγούν σε ενεργοποίηση του μηχανισμού επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετατροπής, β) παραγωγή χημικών ουσιών όπως ρίζες οξυγόνου που είναι μεταλλαξογόνες και γ) δημιουργία γενωμικής αστάθειας είτε άμεσα με την πρόκληση βλαβών στο DNA, είτε έμμεσα επηρεάζοντας τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, ή και τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Grivennikov et al., 2010; Colotta et al., 2009; Hanahan και Weinberg, 2011).

➤ Επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού

Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις. Τα καρκινικά κύτταρα προβαίνουν σε προσαρμογές του κυτταρικού μεταβολισμού με σκοπό την ενεργειακή κάλυψη της ανάπτυξης και της κυτταρικής διαίρεσης. Κάτω από αερόβιες συνθήκες τα φυσιολογικά κύτταρα χρησιμοποιούν τη γλυκόζη για την παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε αναερόβιες συνθήκες προτιμάται η γλυκόλυση,

μόνο μικρή ποσότητα πυροφωσφορικού προωθείται στα μιτοχόνδρια και ο μεταβολισμός οδηγείται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Πριν από αρκετές δεκαετίες ο Warburg παρατήρησε ότι ακόμα και παρουσία οξυγόνου, τα καρκινικά κύτταρα περιορίζουν τον μεταβολισμό τους στη γλυκόλυση, χρησιμοποιώντας μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται ως 'αερόβια γλυκόλυση'. Έτσι τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να ξεπεράσουν την κατά περίπου 18 φορές μικρότερη παραγωγή ATP από τη γλυκόλυση σε σχέση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτό το καταφέρνουν με την αυξημένη ενεργοποίηση μεταφορέων γλυκόζης και συγκεκριμένα του GLUT1, με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση εισόδου γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα. Επίσης χρησιμοποιώντας τα κύτταρα το γλυκολυτικό δρόμο αυξάνουν τη δυνατότητα παραγωγής μακρομορίων και οργανιδίων που είναι απαραίτητα για την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό.

Η οδός της γλυκόλυσης συνδέεται με ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως τα *RAS* και *MYC* και ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το *p53*. Επιπροσθέτως, οι υποξικές συνθήκες που συχνά επικρατούν εντός των όγκων επιτείνουν τη χρησιμοποίηση της γλυκόλυσης με μηχανισμό που περιλαμβάνει και τους παράγοντες HIF1 και HIF2. Τέλος και η οδός της PI3K-Akt-mTOR συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου (Vander Heiden et al., 2009; Hanahan και Weinberg, 2011).

1.2 Φλεγμονή

1.2.1 Ορισμός και χαρακτηριστικά της φλεγμονής

Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει εξελιχθεί ώστε να προστατεύει τον ξενιστή από την επίδραση διαφόρων βλαπτικών παραγόντων και να βοηθά στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Στους βλαπτικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί (όπως βακτήρια, ιοί και μύκητες), κυτταρικές ή ιστικές βλάβες, χημικές ουσίες, ακτινοβολία, τοξίνες, ιστικό στρες, αλλεργιογόνα, δηλητήρια κ.α. Με τον όρο φλεγμονή αναφερόμαστε στο σύνολο των τοπικών και συστηματικών μηχανισμών που ενεργοποιεί ο οργανισμός ως απάντηση : α) στη δράση βλαπτικών παραγόντων ή β) στην απόκλιση από το φυσιολογικό κάποιων στοιχείων που επηρεάζουν τη κυτταρική και ιστική ομοιοστασία (πχ. ιστικό στρες).

Μακροφάγα των ιστών, μαστοκύτταρα (σε κάποιους ιστούς) και αισθητήριοι νευρώνες αποτελούν τους πληθυσμούς κυττάρων που συμμετέχουν στην ανίχνευση του βλαπτικού παράγοντα ή του ιστικού στρες και επάγουν την έναρξη φλεγμονής. Η ανίχνευση γίνεται είτε άμεσα (πχ. μέσω υποδοχέων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοτίβα- PRRs, pattern recognition receptors), είτε έμμεσα μέσω του αποτελέσματος στην ομοιοστασία του ιστού (πχ. ανιχνεύοντας κύτταρα που πεθαίνουν χωρίς να είναι αποπτωτικά, προϊόντα αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας, ιστική βλάβη κ.α). Είναι γνωστό πως τα μακροφάγα παράγουν κυτταροκίνες όταν αντιλαμβάνονται την ύπαρξη παθογόνων ή VEGF σε κατάσταση υποξίας. Παρομοίως, οι αισθητήριοι νευρώνες εξειδικεύονται στην ανίχνευση στρεσογόνων παραγόντων όπως: αλλαγές στη θερμοκρασία, δραστικές χημικές ουσίες, χαμηλό pH κ.α. (Chovatiya και Medzhitov, 2014).

Η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από μία σειρά γεγονότων: α) από τη στρατολόγηση και δράση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, β) έκκριση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, πρωτεασών, δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), γ) καταστροφή της εξωκυττάριας μήτρας με επακόλουθο την παροδική αλλαγή της αρχιτεκτονικής του ιστού. Όλα τα παραπάνω διέπονται από τη συνεχή αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των κυττάρων που απαρτίζουν φυσιολογικά τον ιστό.

Υπάρχουν δύο είδη φλεγμονής: η οξεία και η χρόνια. Η οξεία φλεγμονή αποτελεί την άμεση και πρώιμη απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος στο βλαπτικό παράγοντα. Έχει μικρή διάρκεια και χαρακτηρίζεται από τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων, μονοπύρηνων κυττάρων (μονοκύτταρα, μακροφάγα), ηωσινόφιλων και βασεόφιλων, τα οποία καταστρέφουν κι απομακρύνουν το βλαπτικό παράγοντα, επιδιορθώνουν τις ιστικές

βλάβες και ενεργοποιούν μηχανισμούς ανοσιακής μνήμης. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, η φλεγμονή δε λύεται με την απομάκρυνση του βλαπτικού παράγοντα. Αντιθέτως, είναι εμμένουσα για μεγάλο χρονικό διάστημα, συχνά ασυμπτωματική και συνήθως οι συνθήκες κάτω από τις οποίες διατηρείται είναι αδιευκρίνιστες. Αυτή η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλεί την εγκατάσταση χρόνιας φλεγμονής. Λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και πλάσματοκύτταρα πρωτοστατούν στη χρόνια φλεγμονή. Τα κύτταρα αυτά είναι άμεσα ή έμμεσα υπεύθυνα για την παραγωγή και έκκριση κυτταροκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων τα οποία και επηρεάζουν την ομοιοστασία των φυσιολογικών κυττάρων του ιστού (Balkwill et al., 2005; Fantini και Pallone, 2008).

Η οξεία φλεγμονή θεωρείται ευεργετική. Η χρόνια φλεγμονή, αντιθέτως, προάγει διάφορες χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην αποσαφήνιση της μοριακής βάσης της φλεγμονής. Παράγοντες φλεγμονής και μεταγραφικοί παράγοντες, όπως: 5-λιποοξυγενάση (5-LOX), μόρια προσκόλλησης, χημειοκίνες, κυτταροκίνες, AP-1, κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), ιντερλευκίνες, NF-κΒ, μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), STAT3, TWIST, παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF) και VEGF είναι κάποιοι μοριακοί σύνδεσμοι μεταξύ φλεγμονής και χρόνιων ασθενειών. Οι προ-φλεγμονώδεις μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ και STAT3 θεωρούνται οι κύριοι ρυθμιστές της φλεγμονής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ο NF-κΒ ρυθμίζει περισσότερα από 500 γονίδια που έχουν συσχετισθεί με τον καρκίνο (Gupta et al., 2018; Aggarwal, 2004; Aggarwal et al., 2009).

1.2.2 Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ)

1.2.2.1 Ορισμός και χαρακτηριστικά της IBD

Με τον όρο «ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου» (inflammatory bowel disease- IBD) περιγράφεται ένα σύνολο κλινικών καταστάσεων, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων είναι η παρουσία χρόνιας φλεγμονής στο γαστρεντερικό σωλήνα. Οι δύο κυριότερες νόσοι είναι η ασθένεια του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα και παρά το γεγονός ότι μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά, διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς τη γενετική προδιάθεση, τους παράγοντες κινδύνου, αλλά και ως προς την κλινική, ενδοσκοπική και ιστολογική εικόνα. Στη νόσο του Crohn η φλεγμονή μπορεί να εμφανιστεί ως μεμονωμένη σε ένα ή περισσότερα σημεία κατά μήκος της πεπτικής οδού,

συμπεριλαμβανομένων του λεπτού και του παχέος εντέρου, του ορθού και του τυφλού. Στην ελκώδη κολίτιδα η φλεγμονή εμφανίζεται ομοιογενώς κατανεμημένη στο ορθό και αρκετά συχνά σε ολόκληρο το κόλον (Harris και Chang, 2018; Ordás et al., 2012).

1.2.2.2 Παθογένεια της IBD

Η επίπτωση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου φαίνεται πως έχει αυξηθεί, ειδικά στις αναπτυγμένες χώρες. Η βιομηχανοποίηση και ανάπτυξη των περιοχών συνεπάγεται εύκολη πρόσβαση σε ιατρική περίθαλψη και καλύτερες συνθήκες υγιεινής. Το γεγονός αυτό μειώνει την έκθεση των κατοίκων σε εντερικές λοιμώξεις κατά την παιδική ηλικία, περιορίζει την ωρίμανση του ανοσοποιητικού στην περιοχή του εντερικού βλεννογόνου, με τελικό αποτέλεσμα την αδυναμία σωστής ανοσοαπόκρισης όταν σε μεγαλύτερη ηλικία εκτίθενται σε παθογόνα (Ordás et al., 2012).

Οι αιτιολογικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην εκδήλωση της IBD είναι σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστοι. Γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο κι αυτό αποδεικνύεται από έρευνες σε μονοζυγωτικούς διδύμους. Πολλά γονίδια έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στην παθογένεια των δύο νόσων. Παρ' όλα αυτά, το γεγονός ότι σε άτομα με γενετική προδιάθεση λαμβάνει χώρα μία αφύσικη ανοσολογική απόκριση απέναντι στη συμβιωτική χλωρίδα του εντέρου με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής στο έντερο, υποδηλώνει πως περιβαλλοντικοί παράγοντες (πχ. το κάπνισμα), εκτός από γενετικούς, παίζουν μεγάλο ρόλο στην έναρξη και εκδήλωση των νόσων αυτών (Reid και Carey, 2011).

Ο εντερικός βλεννογόνος βρίθει στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος. Υπάρχουν περισσότερες από 300 πλάκες του Peyer και 30.000-50.000 αθροίσεις λεμφοκυττάρων στο λεπτό και στο παχύ έντερο. Επίσης, μεγάλος αριθμός μακροφάγων, Τ λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων εντοπίζονται στο χόριο του βλεννογόνου, αλλά και άφθονα Τ λεμφοκύτταρα στο εντερικό επιθήλιο. Το κίνητρο για την παρουσία όλων αυτών των κυττάρων στο επιθήλιο και στο χόριο είναι η φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα (MacDonald et al., 2012).

Το έντερο των θηλαστικών αποικείται από τρισεκατομμύρια είδη μικροοργανισμών (μικροβίωμα), τα περισσότερα από τα οποία είναι συμβιωτικά βακτήρια. Πιστεύεται πως η διατήρηση της ομοιόστασης επιτελείται μέσω του επιθηλιακού φραγμού (ο οποίος αποτρέπει την είσοδο των βακτηρίων και των αντιγόνων στο χόριο), αλλά και μέσω της ανοσορρύθμισης. Η ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης πραγματοποιείται με δύο τρόπους:

α) η έκκριση του TGFβ1 από τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα και τους μυοινοβλάστες που υπάρχουν στο χόριο καταστέλλει τις δραστικές αποκρίσεις τύπου Th1. β) Η IL-10 που παράγεται από διάφορα είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού έχει επίσης ανοσοκατασταλτική δράση (Kamada et al., 2013; MacDonald et al., 2012).

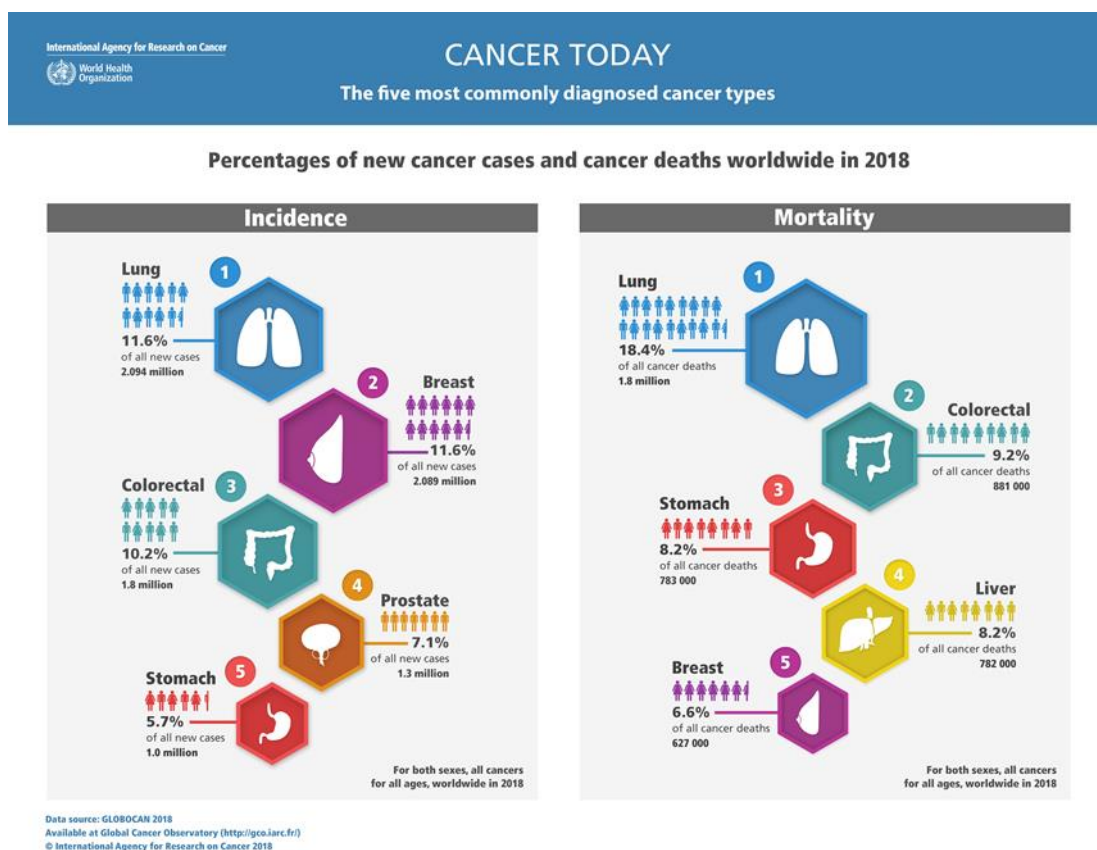
Μια πιθανή αιτιολογία για την εμφάνιση της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, είναι η υπερευαίσθητοποίηση των T λεμφοκυττάρων έναντι μη παθογόνων αντιγόνων που εκτίθενται στην επιφάνεια του μικροβιώματος. Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον αντιγόνων συμβιωτικών βακτηρίων, αλλά και εναντίον αυτοαντιγόνων. Συνοπτικά, η επιλεκτική απώλεια ανοχής ως προς τη χλωρίδα του εντέρου συνοδεύεται από αφύσικη και έντονη ενεργοποίηση του μηχανισμού ανοσίας κι αυτό οδηγεί σε δυσβίωση ή και απώλεια του μικροβιώματος που κανονικά διαφυλάσσει την ακεραιότητα του εντερικού βλεννογόνου. Ο βλεννογόνος αποτελεί φυσικό φραγμό και μαζί με το ανοσοποιητικό σύστημα εμποδίζει την απευθείας επαφή με μικρόβια και αντιμικροβιακά πεπτίδια. Τελικά, η ανεπαρκής λειτουργία του φραγμού αυξάνει την έκθεση του εντερικού επιθηλίου στα μικρόβια, προκαλώντας περαιτέρω ενεργοποίηση των τοπικών μηχανισμών ανοσίας και κατά συνέπεια, επιδείνωση της φλεγμονής. Η δυσβίωση συμβάλλει στην εκδήλωση της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, αλλά αποτελεί και συνέπεια της τελευταίας (Armstrong et al., 2018; Kho και Lal, 2018).

1.3 Καρκίνος του παχέος εντέρου

1.3.1 Ορισμός και επιδημιολογικά δεδομένα

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου ή ορθοκολικός καρκίνος περιλαμβάνει όλους τους κακοήθεις επιθηλιακούς όγκους του ορθού και του κόλου. Η πλειονότητα των καρκίνων του παχέος εντέρου ξεκινούν από έναν αδеноματώδη πολύποδα (αδένωμα) και είναι καλά οριοθετημένες μάζες δυσπλαστικού επιθηλίου, με ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων που βρίσκονται στις κρύπτες. Ένα νεόπλασμα θεωρείται κακόηθες μόνο όταν διηθήσει την βλεννογόνια μυική στιβάδα και εισχωρήσει στον υποβλεννογόνιο χιτώνα.

Όσον αφορά την επίπτωση, ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί τον τρίτο πιο συχνό τύπο καρκίνου για το έτος 2018 (**Εικόνα 9**) και το δεύτερο κατά σειρά στις αιτίες θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Εμφανίζεται κυρίως σε άτομα άνω των 50 ετών και ο κίνδυνος εμφάνισής του αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας. Αν διαγνωσθεί σε πρώιμο στάδιο, θεωρείται ιάσιμος.



Εικόνα 9. Η επίπτωση και η θνησιμότητα των 5 κυριότερων τύπων καρκίνου παγκοσμίως για το 2018. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι τρίτος σε νέα περιστατικά και δεύτερος σε θνησιμότητα. Πηγή: GLOBOCAN 2018.

Στους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου συμπεριλαμβάνονται τα εξής:

- Δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, καθιστική ζωή, κάπνισμα, κατανάλωση κρέατος και αλκοόλ
- Οικογενειακό ιστορικό ή προσωπικό ιστορικό προηγούμενης νόσησης από καρκίνο του παχέος εντέρου
- Νόσηση από ΙΦΝΕ (ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου) και συγκεκριμένα από χρόνια ελκώδη κολίτιδα ή Νόσο του Crohn

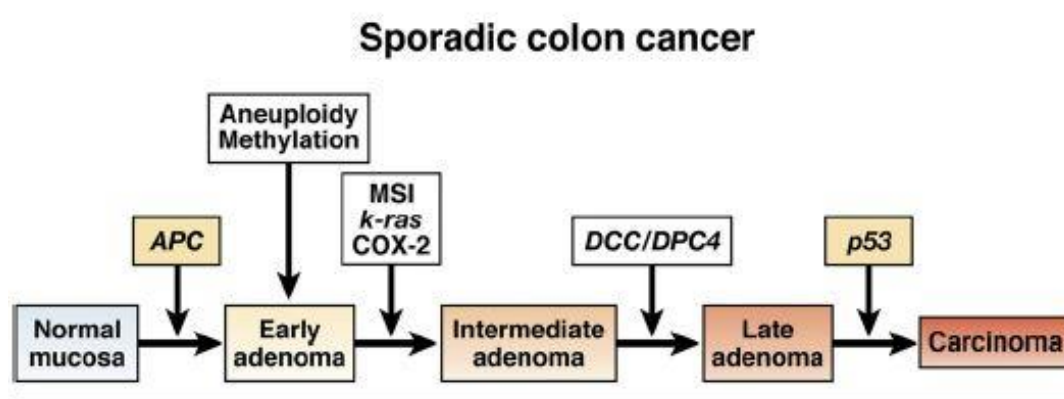
Το 90% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου παχέος εντέρου είναι σποραδικοί και μόλις το 10% είναι κληρονομικοί ή οικογενούς αιτιολογίας (The International Agency for Research on Cancer, 2000; Sandouk et al., 2013).

1.3.2 Μοριακή παθογένεση του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου

Στον σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου (SCC, sporadic colon cancer) παρατηρούνται δύο μορφές γενωμικής αστάθειας: η χρωμοσωμική αστάθεια (ευθύνεται για το 85% του SCC) και η μικροδορυφορική αστάθεια (ευθύνεται για το 15% του SCC). Η χρωμοσωμική αστάθεια οδηγεί σε ανώμαλο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, καθώς και σε ανευπλοειδίες. Έτσι, συχνά παρατηρείται απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH, loss of heterozygosity), η οποία συμβάλλει στην απώλεια λειτουργικότητας σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (πχ. APC-adenomatous polyposis coli και *p53*). Τα γονίδια αυτά μπορούν να καταστούν μη λειτουργικά και μέσω τυχαίων μεταλλάξεων. Σε κάθε περίπτωση πάντως, η συσσώρευση αλλοιώσεων σε ογκοκατασταλτικά, κυρίως, γονίδια είναι η κινητήριος δύναμη για την ανάπτυξη σποραδικού αδενοκαρκινώματος. Η απώλεια λειτουργίας του APC συμβαίνει πρώιμα (**εικόνα 10**). Όσο εξελίσσεται το αδένωμα (αυξάνει το μέγεθός του κι ο βαθμός δυσπλασίας), παρατηρείται ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *k-ras* κι απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων (DCC, deleted in colon cancer) στη χρωμοσωμική θέση 18q. Η απώλεια του *p53* συμβαίνει αργότερα και θεωρείται ως το καθοριστικό γεγονός για την εξέλιξη του αδενώματος σε καρκίνωμα. Η μικροδορυφορική αστάθεια επιτυγχάνεται μέσω απώλειας λειτουργικότητας γονιδίων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση λάθος βάσης του DNA (κυρίως του *hMLH1* και του *hMSH2*). Τα λάθη στην αντιγραφή προσπαθούν να επιδιορθωθούν από άλλα γονίδια που έχουν επιδιορθωτικό ρόλο. Αν όμως συμβεί μεταλλαγή ή απώλεια και σε αυτά, συσσωρεύονται αντιγραφικά λάθη σε όλο το γονιδίωμα, τα οποία επηρεάζουν κυρίως γονίδια που περιέχουν μικρές

επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Οι επαναλαμβανόμενες αυτές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που περιέχουν, ως γνωστόν είναι ασταθείς και ευάλωτες σε αντιγραφικά λάθη. Τελικά, προκύπτει μικροδορυφορική αστάθεια, χάνεται η ομοιοστασία των κυττάρων του εντέρου και αναπτύσσεται κακοήθεια.

Επιγενετικές τροποποιήσεις συμβάλλουν κι εδώ στην τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης, με φαινόμενα υπερμεθυλίωσης σε γονίδια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, σε γονίδια κυτταρικής προσκόλλησης και σε γονίδια που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA (Cooks et al., 2013; Itzkowitz, 2004).



Εικόνα 10. Στάδια μοριακής παθογένεσης του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου (MSI, microsatellite instability: μικροδορυφορική αστάθεια). Τροποποίηση από: (Ullman και Itzkowitz, 2011).

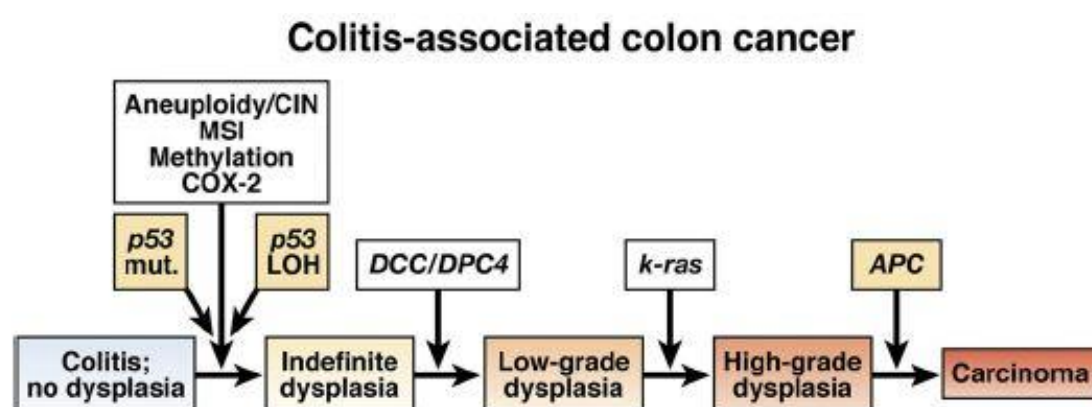
1.3.3 Σχέση IBD και καρκίνου του παχέος εντέρου

Τα άτομα που νοσούν από φλεγμονώδη νόσο του εντέρου έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκινώματα στη γαστρεντερικό οδό. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκινώματος στο παχύ έντερο είναι μάλιστα υψηλότερος σε άτομα που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα. Το ορθοκολικό αδενοκαρκίνωμα, αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια σε άτομα που νοσούν από IBD. Υπάρχει η τάση οι ασθενείς αυτοί να εμφανίζουν αδενοκαρκίνωμα 5-10 χρόνια νωρίτερα από το γενικό πληθυσμό και υπό τη μορφή πολλαπλών όγκων. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, η επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου (CRC, colorectal cancer) σε άτομα με βαριάς μορφής κολίτιδα είναι 19 φορές υψηλότερη από το γενικό πληθυσμό. Δέκα χρόνια μετά τη διάγνωση της ελκώδους κολίτιδας, το 3% των ασθενών εμφανίζει καρκίνο στο παχύ έντερο, ενώ ο κίνδυνος εμφάνισης αυξάνει εκθετικά με την αύξηση της ηλικίας. 30 χρόνια μετά τη

διάγνωση, περισσότερο από 20% των ασθενών με IBD αναπτύσσουν σχετιζόμενο με IBD ορθοκολικό καρκίνο (CAC, colitis-associated cancer), με θνησιμότητα που ξεπερνά το 50% (Terzić et al., 2010; Reid και Carey, 2011).

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης CAC είναι: ο χρόνος νόσησης και η σοβαρότητα της μορφής της IBD (που είναι και οι κυριότεροι), η ιστολογική βαρύτητα της φλεγμονής, το θετικό οικογενειακό ιστορικό σποραδικού CRC (διπλάσια πιθανότητα εμφάνισης CRC) και η εμφάνιση ψευδοπολυπόδων μετά τη φλεγμονή (Ordás et al., 2012).

Οι κύριοι καρκινογενετικοί παράγοντες που οδηγούν σε σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου (χρωμοσωμική αστάθεια, μικροδορυφορική αστάθεια και υπερμεθυλίωση), παίζουν ρόλο και στον CAC (**Εικόνα 11**). Σε αντίθεση με το φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου, ο φλεγμένος παρουσιάζει ανωμαλίες όσον αφορά τα παραπάνω μοριακά μονοπάτια, ακόμα πριν καν εμφανιστεί δυσπλασία ή καρκίνος. Μπορεί οι λόγοι για αυτό να μην είναι ξεκαθαρισμένοι πλήρως, φαίνεται όμως πως οι παραγόμενες από τα φλεγμονώδη κύτταρα δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NOS) επιδρούν σε γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Τέτοια γονίδια είναι: το *p53*, γονίδια που συμμετέχουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA (MMR-mismatch repair, εκτομής βάσης). Παράγοντες όπως ο NF-κβ και κάποιες κυκλοοξυγενάσες συμβάλλουν επίσης στην ανάπτυξη καρκίνου σε έδαφος ΙΦΝΕ.



Εικόνα 11. Στάδια μοριακής παθογένεσης του σχετιζόμενου με κολίτιδα καρκίνου του παχέος εντέρου (MSI, microsatellite instability: μικροδορυφορική αστάθεια). Τροποποίηση από: (Ullman και Itzkowitz, 2011).

Σε γενικές γραμμές, πολλές από τις γενετικές αλλοιώσεις που συναντώνται στο σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου, είναι παρούσες και στον CAC, αλλά η εμφάνιση γενωμικής αστάθειας και μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη P53 συμβαίνουν σε πολύ πρώιμα στάδια στον CAC σε σχέση με τις σποραδικές μορφές.

Πειραματικές μελέτες στις οποίες έγινε χορήγηση παραγόντων που προκαλούν κολίτιδα σε υγιή τρωκτικά ή σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια (με ευπάθεια στον καρκίνο), δείχνουν ότι η ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου επιταχύνεται. Αυτό επιβεβαιώνει το ρόλο της φλεγμονής ως προαγωγού της καρκινογένεσης (Reid και Carey, 2011; Cooks et al., 2013; Itzkowitz, 2004).

1.3.4 Ο ρόλος της ανοσίας και της φλεγμονής στην προαγωγή του καρκίνου

Ο Rudolf Virchow ήταν ο πρώτος που αντιλήφθηκε το 1858 το ρόλο της φλεγμονής και της ανοσίας στην παθογένεση του καρκίνου, όταν ανακάλυψε την παρουσία λευκοκυττάρων σε καρκινικούς ιστούς. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με το μικροπεριβάλλον του όγκου, παρέχουν πληροφορίες για τη διευκρίνιση των υποκείμενων μηχανισμών με τους οποίους η φλεγμονή προάγει την καρκινογένεση. Περίπου 20% των καρκίνων παγκοσμίως σχετίζεται με την ύπαρξη άλυτης λοίμωξης ή χρόνιας φλεγμονής. Έχουν ανευρεθεί συσχετίσεις μεταξύ φλεγμονωδών νοσημάτων και καρκίνου, όπως η IBD με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, η χρόνια λοίμωξη με τους ιούς HBV και HCV με το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η λοίμωξη από *Helicobacter pylori* με το γαστρικό καρκίνωμα, η χρόνια παγκρεατίτιδα με τον παγκρεατικό καρκίνο κ.α (Balkwill και Mantovani, 2001; Ferrone και Dranoff, 2010).

Οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι διηθούνται από διάφορα είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού **(εικόνα 12)**. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC), αλλά και του σχετιζόμενου με κολίτιδα καρκίνου στο παχύ έντερο (CAC), όπου ανιχνεύονται κύτταρα της φυσικής ανοσίας, όπως ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς NK, δένδριτικά κύτταρα και μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο (TAMs, tumor-associated macrophages). Επίσης, οι προχωρημένοι όγκοι στρατολογούν MDSCs (myeloid-derived suppressor cells). Τα κύτταρα αυτά μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά με τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δένδριτικά κύτταρα και συμβάλλουν στην καταστολή της ανοσιακής απάντησης απέναντι στον όγκο, αλλά και στην επαγωγή αγγειογένεσης. Κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας στρατολογούνται επίσης στην περιοχή του όγκου, με προ-

ογκογενετικό ή αντι-ογκογενετικό ρόλο. Τα Τ λεμφοκύτταρα για παράδειγμα παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, στην ανάπτυξη του καρκίνου, στην εξέλιξη του όγκου, αλλά και στην ανοσιακή απόκριση απέναντι στον καρκίνο.

Ειδικότερα, στον CAC η δράση του ανοσοποιητικού συστήματος θεωρείται πως έχει περισσότερο προ-ογκογενετικό ρόλο (συμβάλλει δηλαδή στην καρκινογένεση), ενώ στον CRC φαίνεται να διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ ανοσοεπιτήρησης και φλεγμονής με προ-ογκογενετικό ρόλο. Και στις δύο περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου η ανοσοεπιτήρηση συμβάλλει στην πρώιμη ανίχνευση και εξουδετέρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων και των ανώμαλων κρυπτών που δημιουργούνται, διατηρώντας παράλληλα τους μικρούς όγκους σε λανθάνουσα κατάσταση. Επιπλέον, καίριας σημασίας είναι η ανοσοεπιτήρηση κατά τη διάρκεια της μετάστασης, μιας και κύτταρα που μεθίστανται μπορεί να ανιχνευθούν, εφόσον βρεθούν σε ένα περιβάλλον διαφορετικό από το μικροπεριβάλλον του όγκου στο οποίο συνήθως η αντι-ογκογενετική δράση των κυττάρων της ανοσίας έχει κατασταλεί. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η φλεγμονή ασκεί κατασταλτική επιρροή στην ανοσία εναντίον του καρκίνου σε διάφορα στάδια της ογκογένεσης είτε άμεσα, είτε έμμεσα ρυθμίζοντας την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και την αγγειογένεση.

Κυτταρικός τύπος	Λειτουργία ή μηχανισμός
Τ λεμφοκύτταρα (CD4 και CD8)	• Παραγωγή κυτταροκινών (IL-6, IL-10, IL-21, TNF, IL-17, IL-22, IFN-γ, λεμφοτοξίνη, RANKL) • Τ κυτταροτοξικά (άμεση κυτταροτοξικότητα) ή Τ βοηθητικά
Τ ρυθμιστικά (Tregs)	• Παραγωγή κυτταροκινών (IL-10, TGF-β) • Καταστολή ανοσοαποκρίσεων • Καταστολή φλεγμονής
Μακροφάγα, δένδριτικά, MDSCs, ουδετερόφιλα	• Παραγωγή κυτταροκινών (IL-6, IL-1, VEGF, IL-23, TNF) • Παραγωγή χημειοκινών • Παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας MMP • Αγγειογένεση • Καταστολή ανοσοαποκρίσεων (αργινάση)
NK κύτταρα	• Παραγωγή κυτταροκινών (IFN-γ, IL-22, IL-17)

	• Άμεση κυτταροξικότητα
B λεμφοκύτταρα	• Παραγωγή κυτταροκινών; • Απόκριση αντισωμάτων;
Επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του όγκου	• Παραγωγή IL-1, IL-6, TNF, EGF
Κυτταροκίνη	Μηχανισμοί/μονοπάτια στον καρκίνο και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού
TNF-α	• Επιβίωση, ενεργοποίηση, στρατολόγηση, ανάπτυξη • Ενεργοποίηση AP-1, MAPK και NF-κΒ
IL-6	• Επιβίωση και ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων, επιβίωση και διαφοροποίηση T κυττάρων, στρατολόγηση κυττάρων της μυελοειδούς σειράς • STAT3, ERK και Akt
IL-11	• Επιβίωση, ανάπτυξη • STAT3, STAT1, ERK
IL-23	• Διαφοροποίηση T κυττάρων (Th17) και αλληλεπίδραση με Tregs • Παραγωγή IL-17 και IL-22 από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού • Όχι άμεση επίδραση στα καρκινικά κύτταρα; STAT3
IL-1α, IL-1β	• Επιβίωση, ανάπτυξη, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, ενεργοποίηση και διαφοροποίηση T λεμφοκυττάρων • NF-κΒ, MAPK
IL-22	• Επιβίωση, ακεραιότητα βλεννογόνου, χημειοκίνες, STAT3
IL-17A,F	• Επιβίωση, χημειοκίνες, ρύθμιση T κυττάρων, στρατολόγηση μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων • MAPK, NF-κΒ
EGF	• Επιβίωση, πολλαπλασιασμός • MAPK, STAT3
IL-10	• Αντιφλεγμονώδης, διέγερση των Tregs • Άγνωστη δράση στα καρκινικά κύτταρα • STAT3, MAPK

Εικόνα 82. Κύτταρα του ανοσοποιητικού και κυτταροκίνες που προάγουν τον όγκο στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τροποποίηση από: (Terzić et al., 2010).

Στο σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου η διήθηση του όγκου από λεμφοκύτταρα σχετίζεται με καλή πρόγνωση. Αυτό δεν ισχύει για όλους τους τύπους

καρκίνου και μάλιστα κάποιες υποκατηγορίες Τ λεμφοκυττάρων έχει βρεθεί πως προάγουν την καρκινογένεση στο κόλον. Επίσης, τα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα που υπάρχουν σε μεγάλο αριθμό στο έντερο, καταστέλλουν τη φλεγμονή και την ανοσοαπόκριση απέναντι στον όγκο στο σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου, αλλά γνωρίζουμε πως έχουν αντιογκογενετικές ιδιότητες στους γαστρεντερικούς καρκίνους.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως η σημαντικότερη διαφορά ανάμεσα στον CRC (κι ειδικότερα στον CAC) και σε άλλους επιθηλιακούς καρκίνους είναι πως στους άλλους τα Τ λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο είναι ειδικά για αντιγόνα του όγκου ή για αυτοαντιγόνα κι επομένως μπορούν να τον εξαλείψουν. Αντίθετα, στον CAC πολλά από τα φλεγμονώδη Τ λεμφοκύτταρα είναι στην πραγματικότητα ειδικά για αντιγόνα της συμβιωτικής μικροχλωρίδας και δε μπορούν να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα ευθέως. Επιπλέον, ακόμη και τα κυτταροτοξικά CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω της παραγωγής κυτταροκινών (Gabrilovich και Nagaraj, 2009; Terzić et al., 2010).

1.3.5 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ είναι κύριος ρυθμιστής της φλεγμονής. Ο ρόλος του στον καρκίνο.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ είναι ο κύριος ρυθμιστής της φυσικής ανοσίας και της φλεγμονής. Ανωμαλίες στη ρύθμιση της έκφρασής του έχουν παρατηρηθεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των χρόνιων φλεγμονωδών νόσων. Ειδικότερα, μη φυσιολογική ενεργοποίησή του σε φλεγμονώδη κύτταρα και σε κύτταρα του όγκου, ανιχνεύεται σε περισσότερο από το 50% των καρκίνων του παχέος εντέρου και του CAC, αποδεικνύοντας τη συμβολή του στην παθογένεση του καρκίνου.

Ο NF-κΒ υφίσταται ύπο τη μορφή διμερούς. Τα διαφορετικά διμερή που μπορεί να σχηματίζουν οι υπομονάδες του πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφορετικών γονιδίων. Υπάρχουν 5 μέλη στην οικογένεια του NF-κΒ: p105/p50, p100/p52, RelA (p65), c-Rel και RelB. Τα παραπάνω διμερή διατηρούνται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα είτε ως πρόδρομες μορφές είτε με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνικών αναστολέων IκΒ (inhibitor of κΒ). Τα μονοπάτια σηματοδότησης (PRRs ή φλεγμονωδών κυτταροκινών) ενεργοποιούν το σύμπλοκο της κινάσης IκΒ (IKK), που αποτελείται από μία ρυθμιστική (IKKγ/NEMO) και δύο καταλυτικές υπομονάδες (IKKα και IKKβ). Η IKKβ στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον αναστολέα IκΒ, ο οποίος στοχοποιείται προς ουβικουτινύλωση και

αποδόμηση στο πρωτεάσωμα, αποδεδειγμένα έτσι τον NF-κΒ (κυρίως υπό τη μορφή του διμερούς p65/p50), ο οποίος μπορεί πλέον να μεταναστεύσει στον πυρήνα και να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων.

Ο NF-κΒ ενεργοποιείται καθοδικά του μονοπατιού TLR-MyD88 (η ενεργοποίηση του οποίου επάγεται από μικρόβια και ιστική βλάβη), αλλά και από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (πχ. IL-1, IL-17 και TNF-α). Επιπλέον, η ενεργοποίησή του μπορεί να είναι αποτέλεσμα γενετικών τροποποιήσεων (μεταλλαγή, απώλεια ή ενίσχυση) σε καρκινικά κύτταρα ή ως απόκριση σε καταστάσεις υποξίας. Ο NF-κΒ επάγει την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης, σημαντικών ενζύμων στο μονοπάτι συνθετάσης της προσταγλανδίνης (COX-2) και συνθετάσης του νιτρικού οξέος. Παράλληλα, η ενεργοποίησή του συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην ογκογένεση μέσω αύξησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης, αναστολής της απόπτωσης και προαγωγής της διήθησης και της μετάστασης. Η αντιαποπτωτική λειτουργία του NF-κΒ διενεργείται μέσω της ενεργοποίησης των γονιδίων *Bcl2*, *Bcl-xL*, *cFLIP* κι άλλων αντιαποπτωτικών γονιδίων. Έχει δείχθει πως καρκινικά κύτταρα με ενεργοποιημένο τον παράγοντα NF-κΒ εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και στην ιονίζουσα ακτινοβολία και μάλιστα η αναστολή της λειτουργίας του NF-κΒ αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την κυτταρική ευαισθησία σε αυτούς τους θεραπευτικούς παράγοντες (Ferrone και Dranoff, 2010; Cooks et al., 2013; Colotta et al., 2009; Terzić et al., 2010).

1.3.6 Ο ρόλος της μικροχλωρίδας του εντέρου στην ανάπτυξη του καρκίνου

Μελέτες έχουν δείξει πως η εντερική μικροχλωρίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το ανθρώπινο έντερο περιέχει περισσότερα από 500 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών και το κόλον συγκεκριμένα περισσότερα από 10^{13} βακτηριακά κύτταρα (Gueimonde et al., 2007; Uronis et al., 2009). Η εντερική μικροχλωρίδα παίζει σημαντικό ρόλο ανάπτυξη κι εκπαίδευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, στη διατήρηση της ομοιόστασης της ανοσίας και του μεταβολισμού, επηρεάζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και έχει προστατευτικό ρόλο για τον ξενιστή έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Περίπου το 99% των βακτηρίων του γαστρεντερικού συστήματος είναι αναερόβια. Από αυτά το 60% ανήκει στην τάξη των Firmicutes (η οποία αποτελείται κυρίως από *Clostridium* spp) και περισσότερο από το 20% ανήκει στην τάξη των Bacteroides. Η εντερική μικροχλωρίδα μεταβολίζει τους μη απορροφήσιμους υδατάνθρακες, νεκρά κύτταρα και βλέννη.

Παράλληλα, παράγει μεταβολίτες οι οποίοι επηρεάζουν τη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων, το ενεργειακό ισοζύγιο και τις ανοσοαποκρίσεις. Επίσης, παράγει λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, παράγει βιταμίνες και μεταβολίζει τα χολικά οξέα. Τα βακτήρια είναι απαραίτητα για τη μεταβολική ενεργοποίηση πολλών καρκινογόνων και μεταλλαξογόνων (όπως περιβαλλοντικές πολυαμίνες, φαινόλες και αλκυλιωτικοί παράγοντες). Τέλος, τα βακτήρια που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα επάγουν την παραγωγή IL-10 (επάγει ανοσιακή ανοχή) και IL-17 (προφλεγμονώδης), οι οποίες πιθανολογείται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη του CRC και του CAC (Maynard et al., 2012; Terzić et al., 2010).

Ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων που σχετίζονται με τη μετέπειτα ανάπτυξη καρκίνου είναι η ύπαρξη μεταβολής στο μικροβίωμα ή η εμπλοκή συγκεκριμένων ειδών μικροβίων τόσο στη δημιουργία φλεγμονής όσο και στην ανάπτυξη της ασθένειας. Είναι πολύ λεπτή η ισορροπία που πρέπει να διατηρηθεί μεταξύ των ωφέλιμων συμβιωτικών μικροοργανισμών και των παθογόνων που προσπαθούν να εγκατασταθούν και να ευδοκιμήσουν στον ξενιστή. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι με τους οποίους η εντερική μικροχλωρίδα συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου. Παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να προκαλέσουν εντερική φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοτίβα (PRRs, pattern recognition receptors) ή μέσω ενδοκύττωσης ή προσκόλλησης ή και έκκρισης τοξινών (Sansonetti & Medzhitov, 2009).

Η φλεγμονή στο έντερο, λοιπόν, είναι δυνατό να προκύψει από διαταραχή στο ισοζύγιο μεταξύ της συμβιωτικής μικροχλωρίδας που έχει προστατευτική δράση και της μικροχλωρίδας που έχει προφλεγμονώδες, προ-ογκογενετικό και βλαπτικό δυναμικό. Αλλαγές στον αριθμό, τη βιοποικιλότητα και τη σταθερότητα της μικροχλωρίδας μπορεί να επιφέρουν αλλαγή στο μικροπεριβάλλον του ξενιστή, να οδηγήσουν σε δυσβίωση και να προκαλέσουν ασθένειες ή και CRC. Το *Bacteroides fragilis* παράγει τοξίνη και αν καταφέρει να προκαλέσει ιστικές βλάβες και κολίτιδα, με παράλληλη ενεργοποίηση του STAT3 και παραγωγή IL-17, τότε είναι δυνατό να προάγει και την ανάπτυξη καρκίνου στο παχύ έντερο. Πιθανολογείται πως μόνο βακτήρια που προκαλούν ιστικές βλάβες και φλεγμονή ταυτόχρονα μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου, δηλαδή η φλεγμονή από μόνη της (χωρίς διαδοχικούς κύκλους ιστικής βλάβης και επιδιόρθωσης) είναι ανεπαρκής για την επαγωγή της ογκογένεσης.

Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα κυριότερα μικρόβια (παθογόνα ή συμβιωτικά) και οι μηχανισμοί με τους οποίους φαίνεται πως συμβάλλουν στη διαδικασία της ογκογένεσης. Πολλά είδη βακτηρίων συναντώνται σε μεγάλο αριθμό μέσα ή γύρω από τον όγκο. Η παρουσία τους ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού μπορεί να παράγουν ROS (όπως στην περίπτωση του *Enterococcus faecalis*) ή κυτταροκίνες που προάγουν την επιβίωση και την αγγειογένεση, πχ. IL-6, IL-8, IL-17 (όπως στην περίπτωση των *Streptococcus bovis* και *Bacteroides fragilis*) (Othman et al., 2008; Rakoff-Nahoum και Medzhitov, 2008; Sansonetti και Medzhitov, 2009; Terzić et al., 2010).

Μικρόβιο	Μηχανισμός
Καρκίνος του παχέος εντέρου CRC	
<i>Bacteroides fragilis</i> , enterotoxigenic	Ενεργοποίηση του STAT3 στο παχύ έντερο, πρόκληση ιστικής βλάβης και παραγωγής IL-17
<i>Bacteroides vulgates</i>	Σηματοδότηση που εξαρτάται από το MyD88, πιθανή ενεργοποίηση του NF-κΒ
<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Mitsuokella multiacida</i>	Αυξημένη παρουσία των βακτηρίων
<i>Escherichia coli</i> , invasive	Ενδοκυτταρικός αποικισμός
<i>Enterococcus faecalis</i>	Παραγωγή ROS και πρόκληση βλαβών στο DNA
Germ-free condition	Μειωμένη επίπτωση καρκίνου σε ποντίκια
<i>Salmonella enteritidis</i>	Αυξημένη επίπτωση καρκίνου του παχέος εντέρου σε άτομα με λοίμωξη από <i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	Παραγωγή IL-8, δημιουργία ανώμαλων κρυπτών, αύξηση του πολλαπλασιασμού
Ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου IBD	
<i>Bacteroides fragilis</i>	Διεγείρει την παραγωγή IL-17
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Μεταβολές στη γλυκοζυλίωση (ελατωματική προσκόλληση και μετανάστευση)
<i>Clostridium difficile</i>	Αυξημένη βακτηριακή παρουσία και μετακίνηση
<i>Clostridium leptum</i> και <i>Clostridium coccoides</i>	Μεταβολές στην ποικιλομορφία του μικροβιώματος, με πιθανή αλλαγή προς προφλεγμονώδες/προ-ογκογενετικό δυναμικό
<i>Escherichia coli</i> , invasive	Αποικισμός του εντερικού επιθηλίου, παραγωγή IL-8, IFN-γ, TNF-α και κυτταρική

	προσκόλληση που μεσολαβείται από το (σχετιζόμενο με το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο) μόριο κυτταρικής προσκόλλησης 6
--	--

Εικόνα 9. Τα κυριότερα μικρόβια που έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου, καρκίνου σχετιζόμενου με κολίτιδα και φλεγμονώδους νόσου του εντέρου. Τροποποίηση από: (Terzić et al., 2010; Mughini-Gras et al., 2018).

Ένας αριθμός αρνητικών κατά Gram συμβιωτικών και παθογόνων βακτηρίων παράγει γενotoξίνες. Τρία είδη γενotoξινών έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα: α) η οικογένεια των CDT τοξινών (cytolethal distending toxin), η οποία παράγεται από αρνητικά κατά Gram εξωκυττάρια παθογόνα βακτήρια (όπως: *Escherichia coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *Campylobacter sp.* και *Helicobacter sp.*), β) η τυφοειδής τοξίνη που παράγεται από το προαιρετικά ενδοκυττάριο παθογόνο στέλεχος *Salmonella enterica* οροτύπου Typhi (*S. Typhi*) και γ) η τοξίνη (colibactin) που παράγεται από στελέχη της φυλογενετικής ομάδας B2 της *E.coli*.

Οι τοξίνες CDT μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό με την τυφοειδή τοξίνη, την υπομονάδα CdtB που είναι δομικά και λειτουργικά ομόλογη με τη DNAase I των θηλαστικών. Η δεύτερη λειτουργική υπομονάδα (PltA) της τυφοειδούς τοξίνης έχει δραστηριότητα ADP-ριβосуλοτρανσφεράσης, οι ενδοκυττάριοι στόχοι της οποίας δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη. Η πρόσδεση και η ενσωμάτωση της CdtB υπομονάδας των CDT και της τυφοειδούς τοξίνης στα κύτταρα στόχους μεσολαβείται από τις υπομονάδες CdtA/CdtC και PltB αντίστοιχα.

Οι τοξίνες CDT και (σε μικρότερο βαθμό) η τυφοειδής τοξίνη προκαλούν δικλωνικές θραύσεις στο DNA στα κύτταρα στόχους και επάγεται η ενεργοποίηση του εξαρτώμενου από το ATM μονοπατιού απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR, DNA damage response). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η κυτταρική διαίρεση να σταματά στη G1 ή και στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση που η βλάβη δεν επιδιορθωθεί, επάγεται γήρανση ή απόπτωση ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Τα κύτταρα που επιβιώνουν και αποφύγουν τον επαγόμενο από το DDR κυτταρικό θάνατο ή τη γήρανση, αποκτούν γενωμική αστάθεια και την ικανότητα να αυξάνονται απουσία αυξητικών σημάτων.

Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν αρκετά ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν πως η εμμένουσα ασυμπτωματική λοίμωξη από *S. Typhi*, *S. Enteritidis* και *S. Typhimurium* σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στον άνθρωπο (Del Bel Belluz et al., 2016; Mughini-Gras et al., 2018; Guidi et al., 2013; Graillot et al., 2016).

1.4 Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Λαμβάνοντας υπόψιν προηγούμενες μελέτες οι οποίες ανέδειξαν την ικανότητα η χρόνια λοίμωξη από βακτήρια που παράγουν τη cytolethal distending toxin (CDT) να επάγει το DDR και να προάγει τον καρκινικό μετασχηματισμό στο παχύ έντερο, προχωρήσαμε στη μελέτη της επίδρασης της χορήγησης στελεχών *Salmonella Typhimurium* τα οποία εκφράζουν την ενεργό (TT) ή την ανενεργό μορφή (Delta) της τυφοειδούς τοξίνης σε διαγονιδιακά ποντίκια που έχουν τους ακόλουθους γονότυπους: WT (wild type), *TP53* heterozygous (+/-), *TP53* KO (knock out, -/-), *ATM* heterozygous (+/-), *ATM* KO (knock out, -/-).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσουμε τα ακόλουθα: α) ποια είναι η επίδραση της τυφοειδούς τοξίνης που ανήκει στη κατηγορία των CDT στην ομοιοστασία του εντέρου, β) ποια είναι η επίδραση της τυφοειδούς τοξίνης σε ποντίκια στα οποία έχουν απαλειφθεί πλήρως ή μερικώς ο κύριος ανοδικός ρυθμιστής του μονοπατιού του DDR (*ATM*) και ο βασικός τελεστής του DDR (*p53*). Για να απαντηθούν τα συγκεκριμένα ερωτήματα προχωρήσαμε σε ιστολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη των συγκεκριμένων περιστατικών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε

Όπως αναφέρθηκε και στον πρόλογο, η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί τμήμα ερευνητικής μελέτης, η οποία βρίσκεται σε εξέλιξη, στα πλαίσια συνεργασίας του εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και του εργαστηρίου της Καθηγήτριας Teresa Frisan (Umea University).

Το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Typhi* το οποίο παράγει την τυφοειδή τοξίνη είναι ένα παθογόνο το οποίο προσβάλλει αυστηρά και μόνο τον άνθρωπο και μπορεί να εγκαθιδρύσει χρόνια ασυμπτωματική λοίμωξη σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια. Έτσι, τα περισσότερα δεδομένα σχετικά με τη δράση της τυφοειδούς τοξίνης έχουν προκύψει είτε από μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μεταλλαγμένο στέλεχος, είτε από μελέτες στις οποίες έγινε χορήγηση απομονωμένης, καθαρής τοξίνης σε ανοσοκατεσταλμένα ή μη ποντίκια. Επίσης η οδός μόλυνσης με το βακτήριο (ή χορήγησης της απομονωμένης τοξίνης) δεν αποτελούσε το φυσιολογικό τρόπο εισόδου του βακτηρίου στον ξενιστή.

Για την *in vivo* μελέτη της επίδρασης της τυφοειδούς τοξίνης σε ποντίκια, αναπτύχθηκαν δύο στελέχη *Salmonella enterica* οροτύπου Typhimurium (*S. Typhimurium*), τα οποία προκαλούν συστηματική λοίμωξη, με πυρετό τύπου-τυφοειδή, σε ποντίκια με ανοσοανεπάρκεια. Τα στελέχη *S. Typhimurium* δεν παράγουν κανονικά την τοξίνη και για αυτό κλωνοποιήσαμε τα γονίδια του στελέχους *S. Typhi* *pldB-pltA* και *CdtB* κάτω από τον έλεγχο των ενδογενών υποκινητών τους και τα μεταφέραμε με ομόλογο ανασυνδυασμό στο γονίδιο *proV* του εξασθενημένου MC71 στελέχους της *S. Typhimurium*. Το νέο στέλεχος που προέκυψε είναι πλήρως ικανό να παράγει την ενεργό και δραστική μορφή της τοξίνης (MC71-TT). Επίσης, προβήκαμε στη δημιουργία ενός στελέχους που παράγει την τοξίνη, αλλά σε αδρανή μορφή (MC71-Δ*cdtB*), μέσω απαλοιφής του γονιδίου *cdtB*.

Μέσω πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν από τα εργαστήρια των Drew Wakeham, Tak W MaK και της Teresa Frisan επιβεβαιώθηκαν τα εξής: πρώτον, η τοξίνη παράγεται στο MC71 στέλεχος μόνο εφόσον το βακτήριο εισέλθει στο κύτταρο του ξενιστή και πολλαπλασιαστεί (όπως φυσιολογικά συμβαίνει και με την τυφοειδή τοξίνη), δεύτερον, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι η ίδια στα ανασυνδυασμένα στελέχη που δημιουργήσαμε και τρίτον, τα νέα στελέχη (MC71-TT) έχουν κι αυτά την ικανότητα να προκαλούν βλάβες στο DNA (γενotoξικότητα).

2.2 Τα διαγονιδιακά ποντίκια και ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό μοντέλο αρσενικά και θηλυκά C57BL/6 wild type (WT) ποντίκια, καθώς και διαγονιδιακά ποντίκια του ίδιου στελέχους με τους εξής γονοτύπους: ετερόζυγα (+/-) για *p53*, knockout (KO) για *p53*, ετερόζυγα (+/-) για *ATM* και KO για *ATM*. Τα συγκεκριμένα στελέχη ποντικών αποτελούν ευγενική χορηγία του Tak W Mak, Senior Scientist, PhD (Princess Margaret Cancer Centre, Toronto Canada). Η επιλογή τους οφείλεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος C57BL/6 είναι πολύ ευαίσθητο στη λοίμωξη από *Salmonella enterica*, λόγω ενός πολυμορφισμού στο γονίδιο *Nramp1*. Τα ποντίκια διατηρούνταν σε εγκατάσταση ελεύθερη από παθογόνα.

Η λοίμωξη έγινε μέσω της τροφής, διότι προσομοιάζει την οδό που ακολουθεί η λοίμωξη από *Salmonella Typhimurium* φυσιολογικά μέσω της γαστρεντερικής οδού. Η δοσολογία που ακολουθήθηκε ήταν χορήγηση 10^3 βακτηρίων ανά ποντίκι. Τα ποντίκια θανατώθηκαν 10 μέρες μετά τη λοίμωξη κι ο χειρισμός τους έγινε σύμφωνα με τον Κώδικα Δεοντολογίας της Έρευνας και Βιοηθικής.

Τμήμα 2 εκατοστών αφαιρέθηκε από το λεπτό και το παχύ έντερο αντίστοιχα κάθε ποντικίου και έγινε εγκλεισμός τους σε block παραφίνης, από τα οποία κόπηκαν τομές στη συνέχεια. Στις τομές αυτές ακολούθησε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και ανοσοϊστοχημική χρώση όπως περιγράφεται στις επόμενες ενότητες.

2.3 Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

2.3.1 Η μέθοδος

Ως γνωστόν, οι περισσότεροι ιστοί είναι αχρωμάτιστοι, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η μικροσκοπική εξέταση της μορφολογίας του ιστού και η εξαγωγή συμπερασμάτων. Για αυτό το λόγο, στην Ιστολογία χρησιμοποιείται ευρέως η ιστοχημική μέθοδος της χρώσης με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Η μέθοδος αυτή διατηρήθηκε σχεδόν αναλλοίωτη τα τελευταία 100 χρόνια, διότι δύναται να χρησιμοποιηθεί με μία μεγάλη ποικιλία μονιμοποιητικών υλικών και βοηθά στην αποτελεσματική απεικόνιση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών στοιχείων, αλλά και στοιχείων της εξωκυττάριας μήτρας (Cardiff et al., 2014; Fischer et al., 2008).

Με τη χρώση της αιματοξυλίνης και ηωσίνης, οι πυρήνες (νουκλεϊκά οξέα) βάφονται σκούρο μπλε ή μωβ και το κυτταρόπλασμα (οι πρωτεΐνες) παίρνει μη ειδική κόκκινη ή ροζ ή προτοκαλί απόχρωση (Cardiff, Miller, και Munn 2014). Ακολουθεί περιγραφή των βημάτων της χρώσης:

- 1) **Αποπαραφίνωση**: Τοποθετούμε τα πλακάκια στους 60°C, για 25min, ώστε να λιώσει η παραφίνη.
- 2) **Ενυδάτωση ιστού**: Στη συνέχεια, γίνεται εμβάπτιση των τομών σε μπανάκια που περιέχουν ξυλόλη για να διαλυθεί η εναπομείνουσα παραφίνη:

- Ξυλόλη I 5 min (ξέπλυμα παραφίνης)
- Ξυλόλη II 10 min

Ακολουθεί σταδιακή ενυδάτωση των τομών σε μπανάκια που περιέχουν διάλυματα αυξανόμενης περιεκτικότητας σε αιθανόλη ως εξής:

- Αιθανόλη 100% I 5 min (ξέπλυμα ξυλόλης)
- Αιθανόλη 100% II 10 min
- Αιθανόλη 96% 10 min
- Αιθανόλη 80% 5 min
- Αιθανόλη 70% 3 min
- Αιθανόλη 50% 3 min
- Πλύση σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου

- 3) **Χρώση με αιματοξυλίνη** : βουτάμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη (Harris) και τα αφήνουμε για 5 λεπτά
- 4) Βουτάμε μία φορά τα πλακάκια σε ελαφρώς οξινισμένο διάλυμα αλκοόλης, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αιματοξυλίνης και να παραμείνει μόνο στον πυρήνα
- 5) Πλύση σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 2 λεπτά
- 6) **Χρώση με ηωσίνη**: βουτάμε τα πλακάκια στην ηωσίνη και τα αφήνουμε για 2 λεπτά
- 7) Βουτάμε 2-3 φορές τα πλακάκια και πάλι σε νερό βρύσης
- 8) Ακολουθεί **σταδιακή αφυδάτωση** των τομών σε μπανάκια που περιέχουν διαλύματα μειούμενης περιεκτικότητας σε αιθανόλη ως εξής:
 - Αιθανόλη 50% 3 min
 - Αιθανόλη 70% 3 min
 - Αιθανόλη 80% 5 min
 - Αιθανόλη 96% 10 min
 - Αιθανόλη 100% I 5 min
 - Αιθανόλη 100% II 10 min
 - Ξυλόλη I 10 min
 - Ξυλόλη II 5 min
- 9) Κλείσιμο με κόλλα DPX και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

2.3.2 Ιστολογική αξιολόγηση

Για την ιστολογική αξιολόγηση έγινε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές από όλα τα περιστατικά των ποντικών. Τα περιστατικά αξιολογήθηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου Leica DM LB2, το οποίο είναι συνδεδεμένο με κάμερα Leica και με τη χρήση του προγράμματος Infiniy analyze (edition 6.0). Η εκτίμηση των φλεγμονωδών κυττάρων που διηθούν, αλλά και η εκτίμηση των αλλοιώσεων στο εντερικό επιθήλιο και στην αρχιτεκτονική του βλεννογόνου (τόσο στο λεπτό όσο και στο παχύ έντερο) έγινε με βάση την ακόλουθη βιβλιογραφική παραπομπή (Erben et al., 2014).

2.4 Ανοσοϊστοχημεία

2.4.1 Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μία εργαστηριακή *in situ* τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα και στη διάγνωση. Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές στην ιστοπαθολογία και στην παθολογοανατομία. Βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι αντιγόνων. Λόγω της μεγάλης ειδικότητας της σύνδεσης αντισώματος-αντιγόνου, επιτρέπεται η αναγνώριση της παρουσίας ή όχι, καθώς και του προτύπου έκφρασης πρωτεϊνών σε επίπεδο κυττάρου ή ιστού, χωρίς να διαταράσσεται η σύσταση, τα κυτταρικά χαρακτηριστικά και η δομή του ιστού.

Η ανοσοϊστοχημεία θεωρείται ημιποσοτική μέθοδος διότι, πέρα από ποιοτικές πληροφορίες, μπορεί μετά από σωστή αξιολόγηση της χρώσης να προσφέρει και αδρή εκτίμηση της ποσότητας μιας πρωτεΐνης στο υπό εξέταση δείγμα. Έχει μεγάλη ευαισθησία, επαναληψιμότητα, είναι ταχεία μέθοδος και παρέχει τη δυνατότητα συσχέτισης του εντοπισμού μιας πρωτεΐνης με μορφολογικές παραμέτρους. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε νωπό υλικό, σε παγωμένους ιστούς, σε αρχειακό υλικό, σε υλικό που έχει υποστεί αφαλάτωση ή ακόμη και σε υλικό που έχει υποστεί προηγούμενη χρώση.

Συνοπτικά, ένα πρωτογενές αντίσωμα προσδένεται στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια ακολουθεί η επώαση του συμπλέγματος αντιγόνου-πρωτογενούς αντισώματος με ένα δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το σταθερό τμήμα των IgG του ζωικού είδους στο οποίο έχει παραχθεί το πρωτογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με μία φθορίζουσα ομάδα ή κάποιο ένζυμο (πχ. υπεροξειδάση) ή κάποιο άλλο μόριο (πχ. βιοτίνη) που καθιστά δυνατή την τελική ανίχνευση του συμπλέγματος. Παρακάτω ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή του πρωτοκόλλου της μεθόδου.

1η ημέρα

1. **Αποπαραφίνωση:** Τοποθετούμε τα πλακάκια στους 60°C, για 25min. Με τη διαδικασία αυτή λιώνει η παραφίνη και γίνεται μια πρώτη αντιγονική αποκάλυψη.

2. **Ενυδάτωση ιστού και αποκάλυψη Α σε θερμοκρασία δωματίου**

Στη συνέχεια, γίνεται εμβάπτιση των τομών σε μπανάκια που περιέχουν ξυλόλη για να διαλυθεί η παραφίνη:

- Ξυλόλη Ι 5 min (ξέπλυμα παραφίνης)

- Ξυλόλη II 10 min

Ακολουθεί σταδιακή ενυδάτωση των τομών σε μπανάκια που περιέχουν διαλύματα αυξανόμενης περιεκτικότητας σε αιθανόλη ως εξής:

- Αιθανόλη 100% I 5 min (ξέπλυμα ξυλόλης)
- Αιθανόλη 100% II 10 min
- Αιθανόλη 96% 10 min
- Αιθανόλη 80% 5 min
- Αιθανόλη 70% 3 min
- Αιθανόλη 50% 3 min
- Πλύση τομών με TBS 1x (δύο γρήγορες πλύσεις και αλλαγή μία 5min)

3. Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων/Διάσπαση δεσμών από μονιμοποίηση

Με διάλυμα κιτρικών 10mM pH=6.00 1x ή EDTA 1mM pH=8,0

Προθερμαίνω για 5min το διάλυμα κιτρικών σε φούρνο μικροκυμάτων, 700Watt και στη συνέχεια, επωάζω τις τομές για 25min με το διάλυμα των κιτρικών σε φούρνο μικροκυμάτων

ή

Προθερμαίνω το διάλυμα των κιτρικών σε steamer για 5min κι επωάζω τις τομές για άλλα 40min με το διάλυμα στο steamer

ή

Σε χύτρα για περίπου 5 min.

4. Κατόπιν, αφήνω για 20min τις κιβέτες με τα πλακάκια σε παγωμένο νερό, ώστε να κρυώσει σταδιακά το διάλυμα. Εναλλακτικά τοποθετώ τις κιβέτες στο cold room.

5. Ξεπλένω από τα κιτρικά αποχύνοντάς τα και προσθέτοντας TBS 1X (δύο γρήγορες πλύσεις και μία για 5 min).

6. Αδρανοποίηση ενδογενούς υπεροξειδάσης

Εφόσον γίνεται προσθήκη του ενζύμου της υπεροξειδάσης σε μετέπειτα στάδιο, είναι απαραίτητο να αδρανοποιηθεί η ενδογενής υπεροξειδάση. Για το σκοπό αυτό γίνεται επώαση των τομών με 3% H₂O₂ για 15min. Η επώαση είναι απαραίτητο να γίνεται στο σκοτάδι, διότι το ένζυμο είναι φωτοευαίσθητο. Ακολουθώντας, πραγματοποιούμε πλύση των

τομών με TBS 1x (δύο γρήγορες πλύσεις και αλλαγή μία 5min).

7. **Μπλοκάρισμα μη ειδικού σήματος (Blocking)**

Προσθέτω Ultra V block για 9 min από το kit της ανοσοϊστοχημείας σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιούμε πλύση των τομών με TBS 1x (δύο γρήγορες πλύσεις και αλλαγή μία 5min).

8. **Προσθήκη αραιωμένου αντισώματος**

Προσθέτουμε 50-100 λ (αραιωμένου σε TBS 1X) αντισώματος σε κάθε τομή κι επωάζουμε σύμφωνα με τις κατάλληλες συνθήκες (θερμοκρασία, χρόνο) που ενδείκνυνται για το κάθε αντίσωμα.

2η ημέρα

9. Ξέπλυμα του αντισώματος με TBS 1x (2 γρήγορες πλύσεις και 1 για 5min).

10. **Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα**

Γίνεται προσθήκη του primary antibody enhancer από το kit της ανοσοϊστοχημείας (ειδικό για πρωτογενή αντισώματα που έχουν παραχθεί σε ποντίκι και κουνέλι) κι επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ή εναλλακτικά χρησιμοποιούμε Secondary Antibody-biotin conjugated (anti-Rabbit ή anti-Rat ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) αραιωμένο 1/150 σε TBS 1X για 1h στους 37° C.

11. Ξέπλυμα με TBS 1x (2 γρήγορες πλύσεις και 1 για 5min).

12. **Επώαση με HRP Polymer** από το kit για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι ή εναλλακτικά, επώαση με HRP-streptavidin conjugated, αραιωμένο 1/150 σε TBS 1X, για 30min στους 37° C στο σκοτάδι.

13. Ξέπλυμα με TBS 1x (2 γρήγορες πλύσεις και 1 για 5min).

14. **Χρώση με DAB** (1 DAB : 100 substrate) από το kit με ταυτόχρονη παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

15. Αδρανοποίηση του DAB με νερό.
16. **Χρώση με αιματοξυλίνη 1:2.**
17. **Αφυδάτωση.**
- Αιθανόλη 50% 3 min
 - Αιθανόλη 70% 3 min
 - Αιθανόλη 80% 5 min
 - Αιθανόλη 96% 10 min
 - Αιθανόλη 100% I 10 min
 - Αιθανόλη 100% II 5 min
 - Ξυλόλη I 10 min
 - Ξυλόλη II 5 min
18. Κλείσιμο με κόλλα DPX. Τοποθετούμε μια σταγόνα κόλλας στο πλακάκι και τοποθετούμε την καλυπτρίδα. Η κόλλα είναι διαλυτή στην ξυλόλη.

2.4.2 Αντισώματα και συνθήκες επώασης

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη έγινε χρήση των παρακάτω αντισωμάτων:

1. anti-γH2AX : μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 που παράχθηκε σε ποντίκι. Αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στη φωσφορυλιωμένη θέση Ser139 της H2AX ιστόνης. Αραίωση 1/1500 σε TBS 1X και 1/20 goat serum. Ολονύκτια επώαση στους 4°C. (05-636 | Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) Antibody, clone JBW301, Merck/Millipore)
2. anti-CD3 : πολυκλωνικό αντίσωμα IgG που παράχθηκε σε κουνέλι. Αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στα αμινοξέα 156-168 της E αλυσίδας των CD3 στη μεμβράνη των T λεμφοκυττάρων. Αραίωση 1/150 σε TBS 1x και 1/20 goat serum. Επώαση για 30min στους 37° C και στη συνέχεια, ολονύκτια επώαση στους 4°C. (Anti-CD3 antibody (ab5690), Abcam)
3. anti-B220/CD45R[RAE-6B2] : μονοκλωνικό αντίσωμα IgG2α που παράχθηκε σε αρουραίο. Αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στον επίτοπο CD45 ο οποίος εκφράζεται κυρίως σε αναπτυσσόμενα αλλά και ώριμα B λεμφοκύτταρα. Αραίωση 1/100 σε TBS 1x και

1/40 goat serum. Επώαση για 1h στους 37°C και στη συνέχεια, ολονύκτια επώαση στους 4°C.

(Anti-CD45R antibody [RA3-6B2] (ab64100), Abcam)

4. anti-p65/NF-κB : πολυκλωνικό αντίσωμα IgG1 που παράχθηκε σε ποντίκι. Αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στα αμινοξέα 1-286 του αμινοτελικού άκρου του NF-κB/p65. Αραίωση 1/100 σε TBS 1x. Ολονύκτια επώαση στους 4°C.

(NFκB p65 Antibody (F-6): sc-8008, Santa Cruz)

2.4.3 Μάρτυρες

Η χρήση μαρτύρων (θετικών και αρνητικών) σε κάθε πείραμα κρίνεται αναγκαία για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του πρωτοκόλλου που εφαρμόζεται. Ως θετικός μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιος ιστός ο οποίος, διαπιστωμένα μετά από ενδεδειγμένο έλεγχο της βιβλιογραφίας, είναι θετικός για το αντίσωμα που θέλουμε να μελετήσουμε. Ως αρνητικός μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία σειριακή τομή του ιστού που μελετάμε, στην οποία όλα τα βήματα της πειραματικής μεθόδου θα εφαρμοστούν κανονικά, με εξαίρεση την επώαση με το αντίσωμα. Σε αυτή την περίπτωση δε θα πρέπει να παρατηρηθεί χρώση. Εναλλακτικά, ως αρνητικός μάρτυρας μπορεί να θεωρηθεί μια τομή η οποία έχει επωασθεί με ορό από μη ανοσοποιημένο ζώο ή να γίνει επώαση με IgG από το ίδιο είδος ζώου, το οποίο έχει ανοσοποιηθεί με κάποιο μη βιολογικό μόριο ή να χρησιμοποιηθεί μια τομή η οποία έχει ληφθεί από ζώο στο οποίο έχει γίνει γενετική τροποποίηση και δεν παράγει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (KO, knockout) (Herkenham et al., 2011)

Για το αντίσωμα έναντι του γH2AX χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες ακτινοβολημένοι ιστοί, για το CD3 και CD45R/B220 ποντικίσιος σπλήνας και για το p65 προηγουμένως χαρακτηρισμένα περιστατικά που συμπεριλήφθηκαν στην ερευνητική μελέτη των Cooks et al. (Cooks et al., 2013). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από κάποια από τα περιστατικά, στις οποίες όλα τα βήματα έγιναν κανονικά, εξαιρουμένης της επώασης με το αντίσωμα.

2.4.4 Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε με τη χρήση του μικροσκοπίου Leica DM LB2, το οποίο είναι συνδεδεμένο με κάμερα και με τη βοήθεια του προγράμματος Infinite Analyze (edition 6.0), σε μεγέθυνση X400. Αρχικά επιβεβαιώσαμε ότι δεν υπάρχει

σήμα στους αρνητικούς μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίσωμα ξεχωριστά. Στη συνέχεια, η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω:

- για το anti-γH2AX: προσδιορίστηκε το επί τοις 100 (%) ποσοστό θετικών επιθηλιακών κυττάρων με έντονο πυρηνικό σήμα. Το ποσοστό υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος των θετικών επιθηλιακών κυττάρων που καταμετρήθηκαν ανά 100 επιθηλιακά κύτταρα, από διαφορετικές περιοχές του ιστού.
- Για το anti-CD3: προσδιορίστηκε ο αριθμός των θετικών T λεμφοκυττάρων με έντονο μεμβρανικό σήμα που εντοπίστηκαν στο στρώμα, ανά πεδίο υψηλής ευκρίνειας (HPF- High Power Field, μεγέθυνση 400x). Η τελική τιμή αποτελεί τη μέση τιμή των μετρήσεων που λήφθηκαν από διαφορετικές περιοχές του στρώματος του ιστού.
- Για το anti-B220/CD45R: προσδιορίστηκε ο αριθμός των θετικών B λεμφοκυττάρων με έντονο μεμβρανικό σήμα που εντοπίστηκαν στο στρώμα, ανά πεδίο υψηλής ευκρίνειας (HPF). Η τελική τιμή αποτελεί και πάλι τη μέση τιμή των μετρήσεων που λήφθηκαν από διαφορετικές περιοχές του στρώματος του ιστού.
- Για το anti-p65/NF-kB: προσδιορίστηκε το επί τοις 100 (%) ποσοστό των θετικών επιθηλιακών κυττάρων με έντονο πυρηνικό σήμα. Το ποσοστό υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος των θετικών επιθηλιακών κυττάρων που καταμετρήθηκαν ανά 100 επιθηλιακά κύτταρα, από διαφορετικές περιοχές του ιστού.

2.5 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος IBM SPSS Statistics 25. Για την ανάλυση των δεδομένων και για τη διεξαγωγή πολλαπλών συγκρίσεων μεταξύ των γονοτύπων χρησιμοποιήθηκε περιγραφική στατιστική και η μέθοδος Oneway ANOVA, καθώς και Post Hoc έλεγχοι. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του $p \leq 0.05$ (επίπεδο σημαντικότητας: 0,05).

2.6 Λήψη φωτογραφιών

Η φωτογραφική απεικόνιση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Infinite Analyze (edition 6.0) μέσω Leica κάμερας η οποία είναι συνδεδεμένη στο μικροσκόπιο Leica DM LB2.

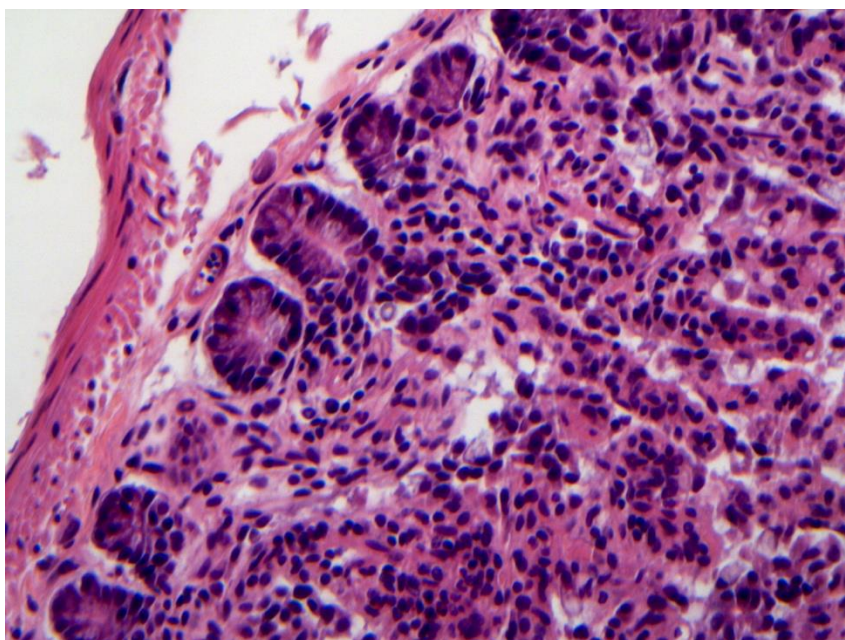
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ιστολογική ανάλυση

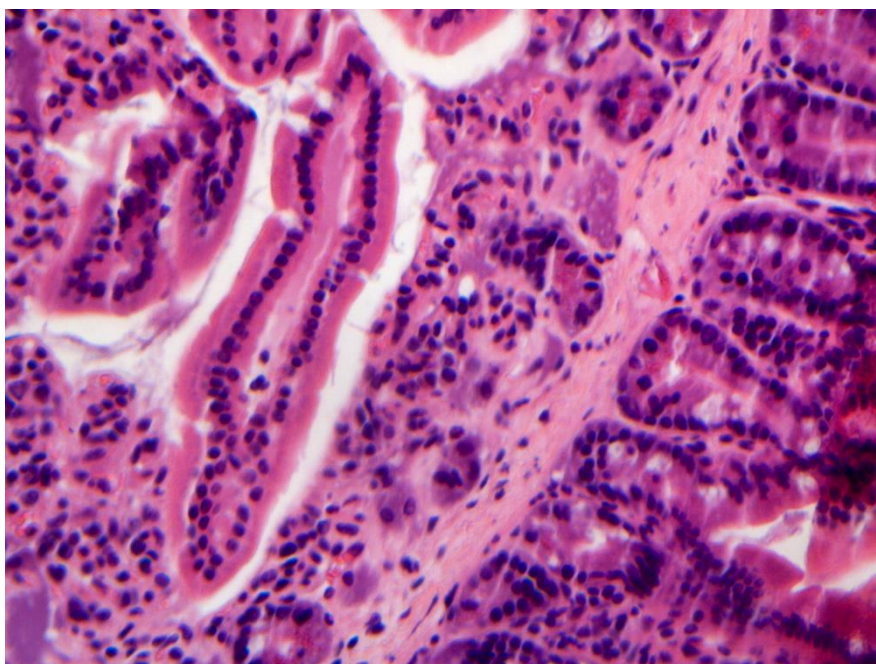
Αρχικά προχωρήσαμε στην ιστολογική ανάλυση όλων των περιστατικών εξετάζοντας τις τομές με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και έγινε έκτιμηση της βαρύτητας της φλεγμονής.

Ήπια χρόνια φλεγμονή παρατηρήθηκε στο λεπτό και στο παχύ έντερο σε όλα τα περιστατικά από τους επιμέρους γονοτύπους. Αυξημένη διαπιστώθηκε η φλεγμονή στο λεπτό έντερο των WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η αδρανής μορφή της τοξίνης (Delta), σε σχέση με τα WT ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε η ενεργός μορφή της τοξίνης (TT). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στο παχύ έντερο σε μικρότερο, όμως, βαθμό. Γενικότερα, η φλεγμονή εκτιμήθηκε ως βαρύτερη σε όλους τους γονοτύπους των ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η αδρανής (Delta) μορφή της τοξίνης.

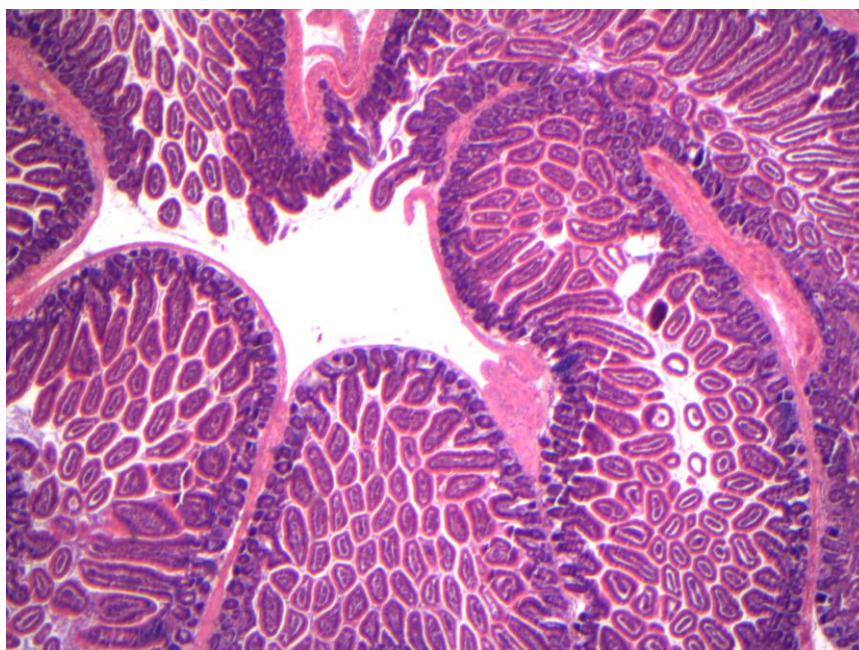
Στις εικόνες που ακολουθούν από τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, διακρίνεται η διαφορά στη βαρύτητα της φλεγμονής στο λεπτό έντερο ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ενεργός και η αδρανής μορφή της τοξίνης, αντίστοιχα.



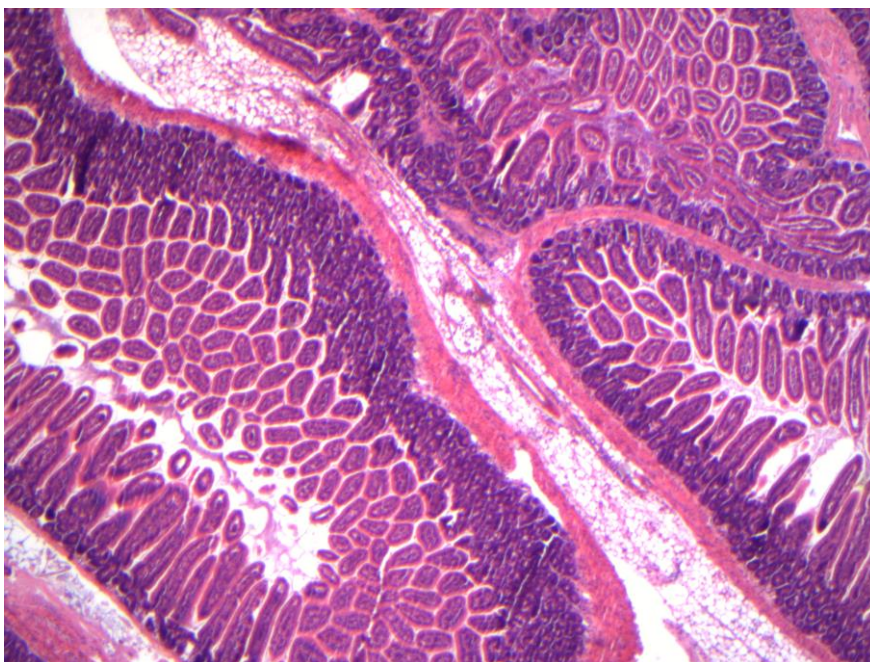
Φωτογραφία 1. Φωτογραφική απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης στο λεπτό έντερο ποντικών WT γονοτύπου στα οποία χορηγήθηκε η Delta ανενεργός μορφή της τοξίνης. Αναγνωρίζεται διάβρωση του επιθηλίου. Μεγέθυνση 25x.



Φωτογραφία 2. Φωτογραφική απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης στο λεπτό έντερο ποντικών WT γονοτύπου στα οποία χορηγήθηκε η Delta ανενεργός μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



Φωτογραφία 3. Φωτογραφική απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης στο λεπτό έντερο ποντικών WT γονοτύπου στα οποία χορηγήθηκε η TT δραστική μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 25x.



Φωτογραφία 4. Φωτογραφική απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης στο λεπτό έντερο ποντικών WT γονοτύπου στα οποία χορηγήθηκε η TT δραστική μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 25x.

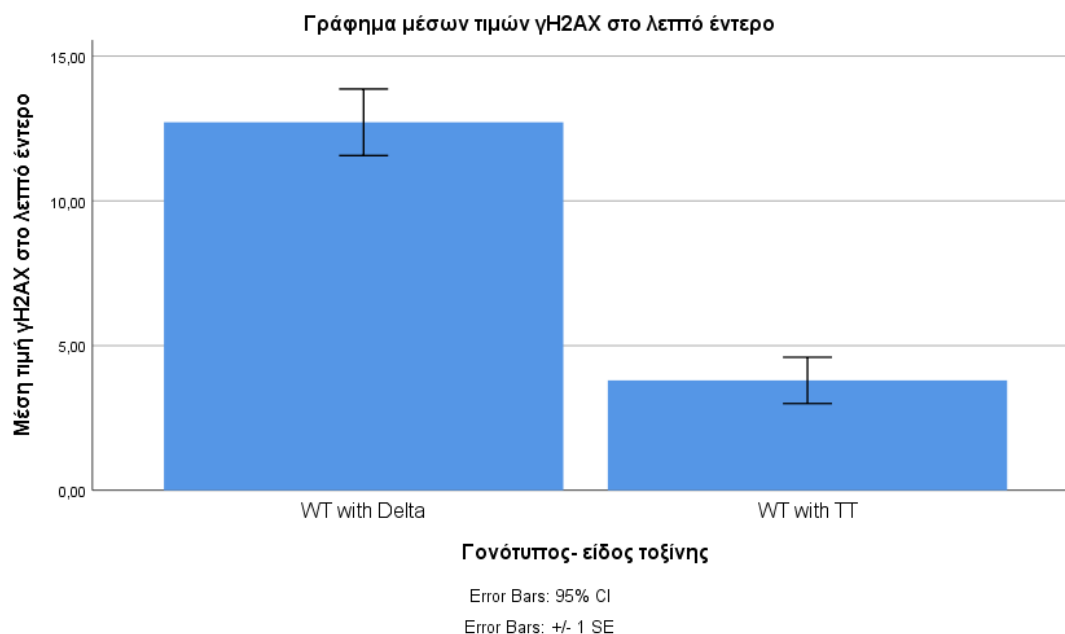
3.2 Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα

Τα ποντίκια με γονότυπο p53 KO στα οποία χορηγήθηκε η αδρανής μορφή (Delta) της τοξίνης, αλλά και τα ποντίκια με γονότυπο ATM KO στα οποία χορηγήθηκε είτε ενεργός (TT) είτε αδρανής (Delta) μορφή της τοξίνης αποκλείστηκαν από τις διαδικασίες στατιστικής επεξεργασίας, διότι στις συγκεκριμένες ομάδες περιλαμβάνεται από 1 διαγονιδιακό ποντίκι μόνο. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται σε γραφήματα τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στο επίπεδο του 0,05, όπως αυτά προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία (ANOVA και Post Hoc tests- LSD) που πραγματοποιήθηκε με σκοπό τις πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων τιμών των μετρήσεων από κάθε επιμέρους γονότυπο στο λεπτό και στο παχύ έντερο.

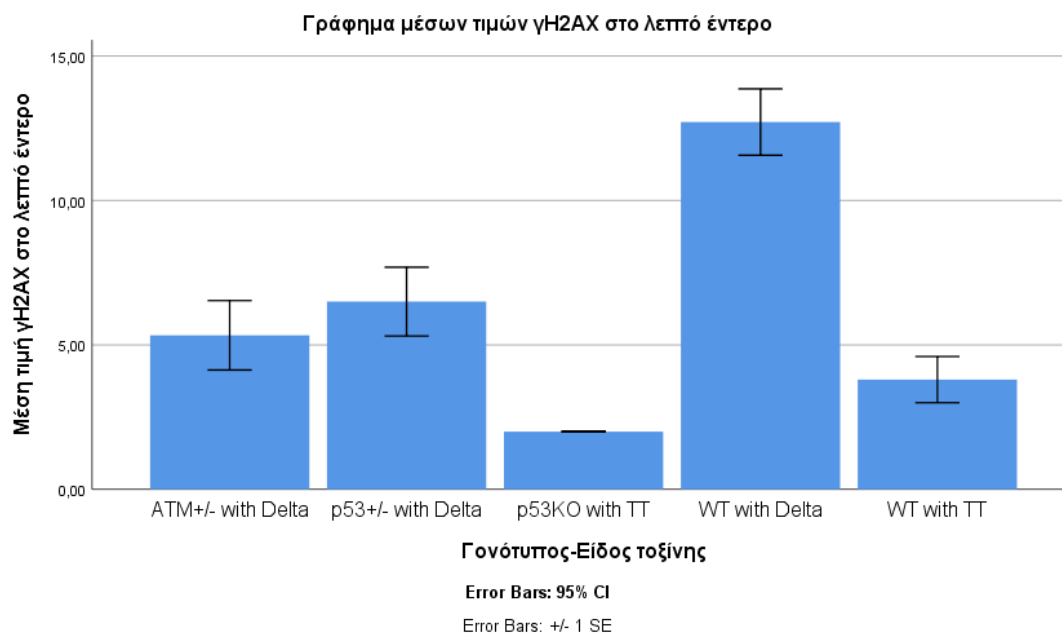
3.2.1 γH2AX δείκτης ενεργοποίησης του DDR ως απόκριση σε δικλωνικές θραύσεις

Με βάση τη γνώση μας από τη βιβλιογραφία ότι οι CDT τοξίνες έχουν δράση DNAase (προκαλούν δικλωνικές θραύσεις στο DNA), καθώς και λαμβάνοντας υπόψιν τα προηγούμενα αποτελέσματα (Guidi et al., 2013; Del Bel Belluz et al., 2016; Graillot et al., 2016) εξετάσαμε με ανοσοϊστοχημεία την ενεργοποίηση του DDR και ειδικότερα μελετήσαμε τη συσσώρευση της πρωτεΐνης γH2AX (η οποία αποτελεί καθιερωμένο βιοδείκτη ενεργοποίησης του DDR ως απόκριση σε δικλωνικές θραύσεις) σε περιστατικά που χορηγήθηκε ενεργός (TT) ή αδρανής (Delta) μορφή της τοξίνης στους επιμέρους γονοτύπους. Ως θετικό σήμα αξιολογήθηκε το βαθύ πυρηνικό.

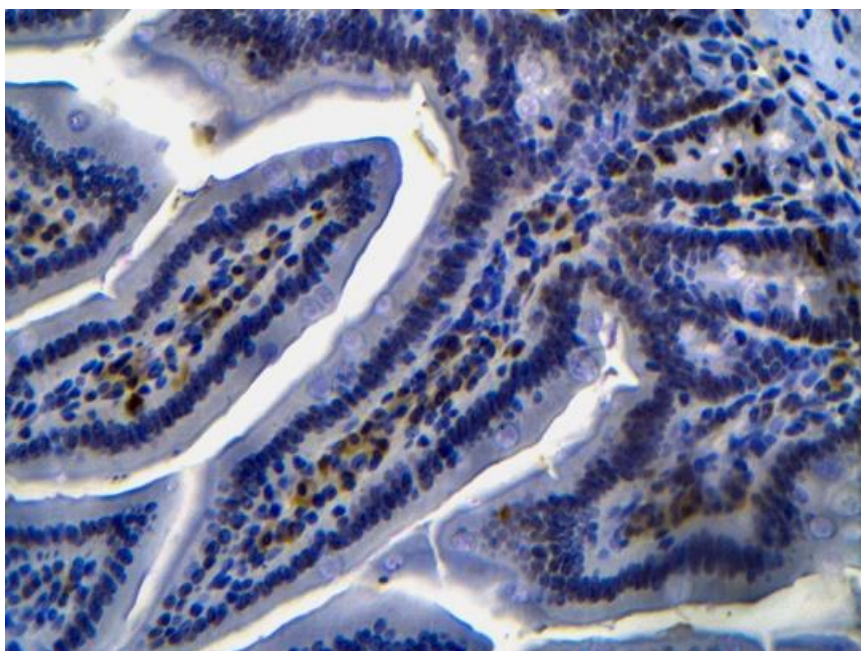
➤ **Στο λεπτό έντερο:**



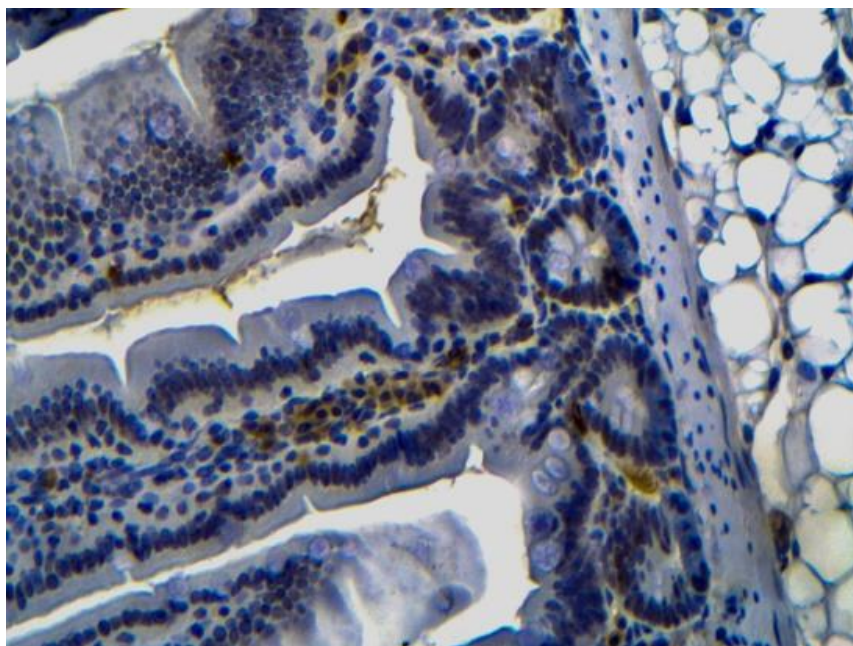
Γράφημα 1. Γράφημα μέσων τιμών για το γΗ2ΑΧ σε WT ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε η αδρανής και η ενεργός μορφή της τοξίνης αντίστοιχα. Η διαφορά των μέσων τιμών βρέθηκε στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 0,05 μέσω Post Hoc tests (LSD).



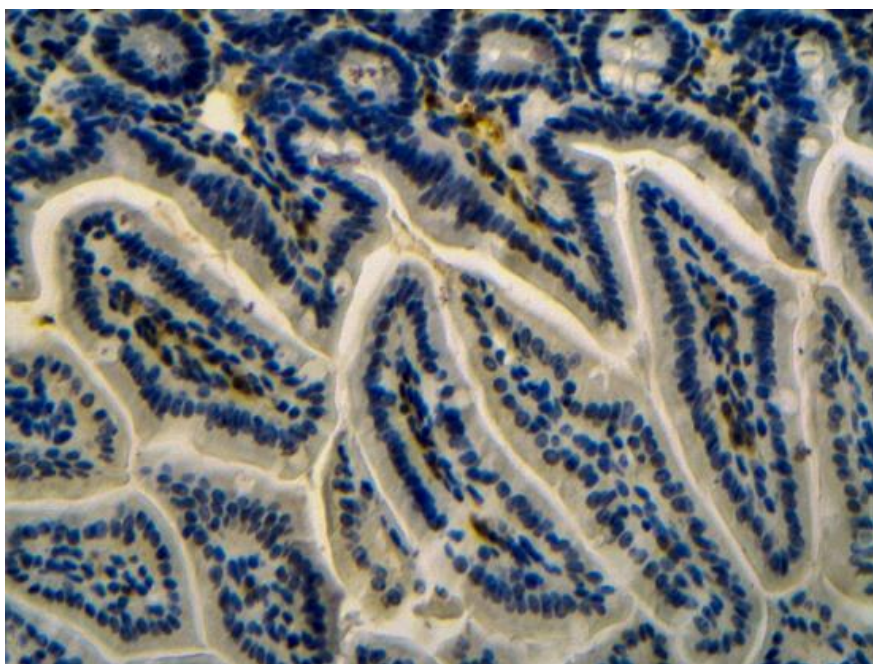
Γράφημα 2. Γράφημα των μέσων τιμών γΗ2ΑΧ στο λεπτό έντερο για τις ομάδες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (σε σχέση με τα WT ποντίκια που έλαβαν την ανενεργό μορφή της τοξίνης) μέσω Post Hoc tests (LSD) στο επίπεδο του 0,05.



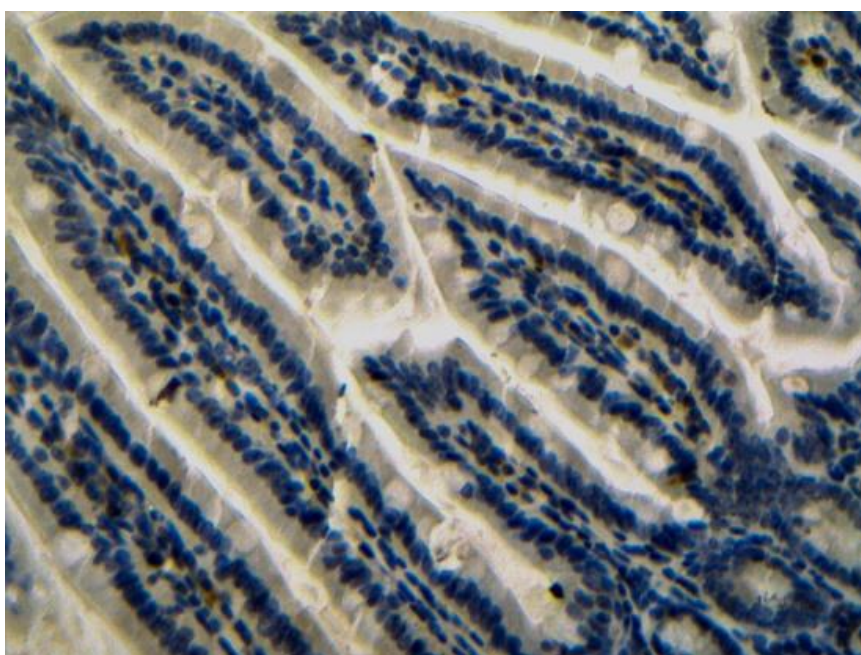
Φωτογραφία 5. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η αδρανής Delta τοξίνη. Μεγέθυνση 200x.



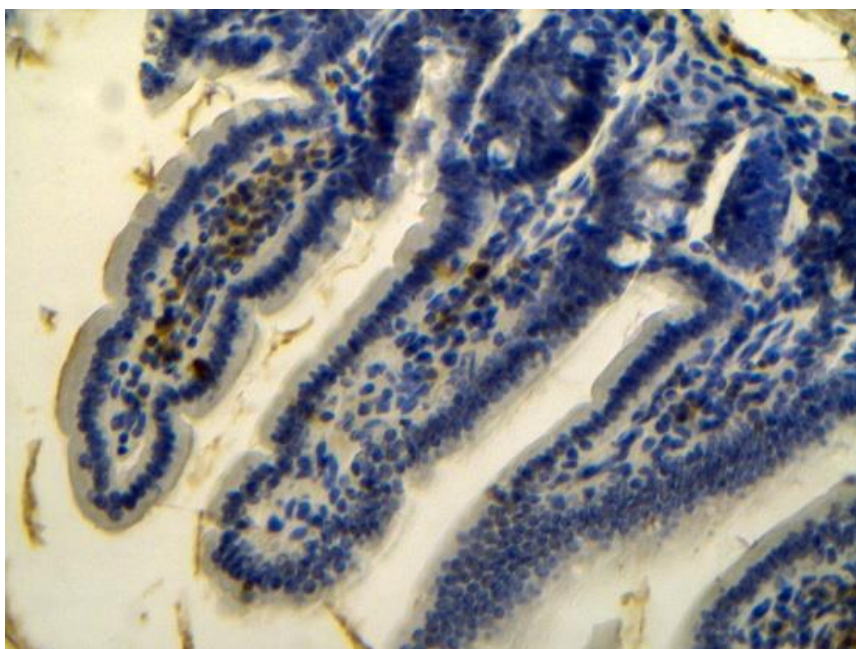
Φωτογραφία 6. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η αδρανής Delta τοξίνη. Μεγέθυνση 200x.



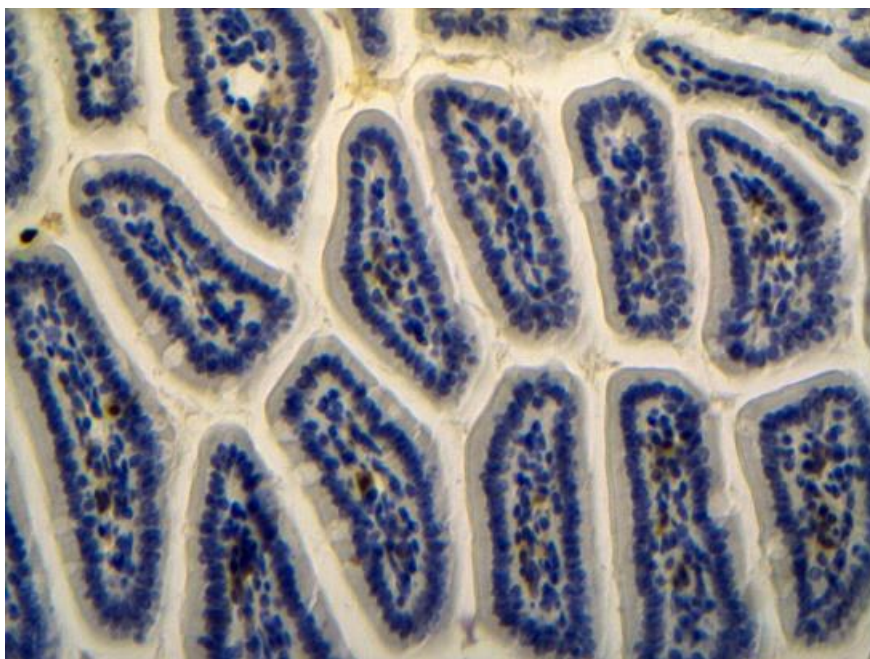
Φωτογραφία 7. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ενεργός TT τοξίνη. Μεγέθυνση 200x.



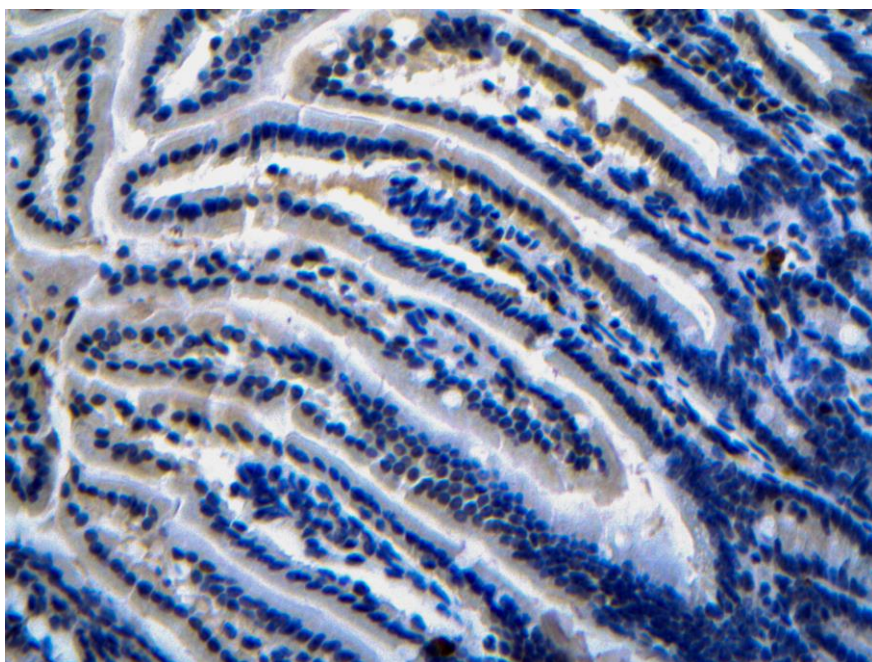
Φωτογραφία 8. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ενεργός TT τοξίνη. Μεγέθυνση 200x.



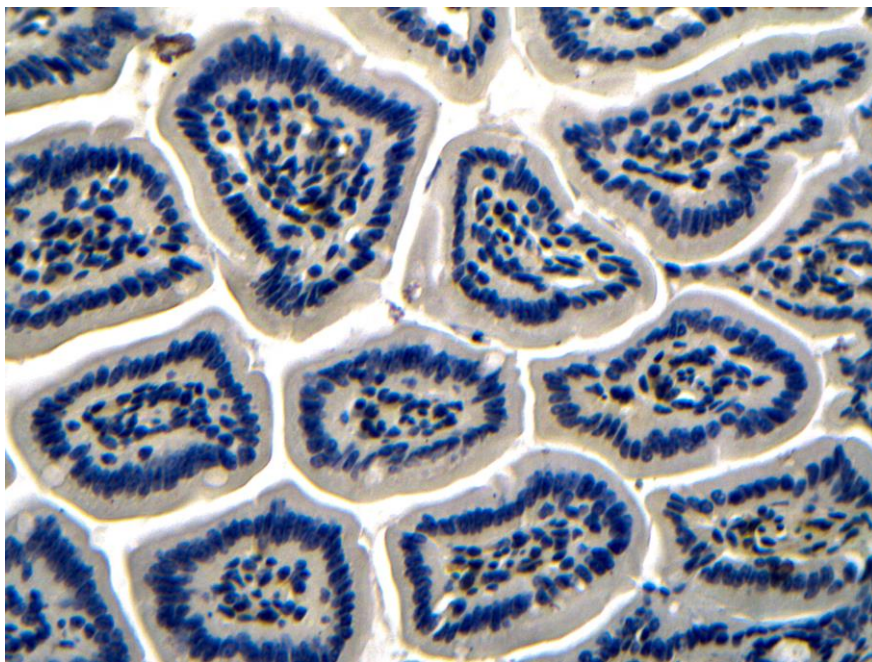
Φωτογραφία 9. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο ποντικών με γονότυπο p53+/- στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



Φωτογραφία 10. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο ποντικών με γονότυπο p53+/- στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

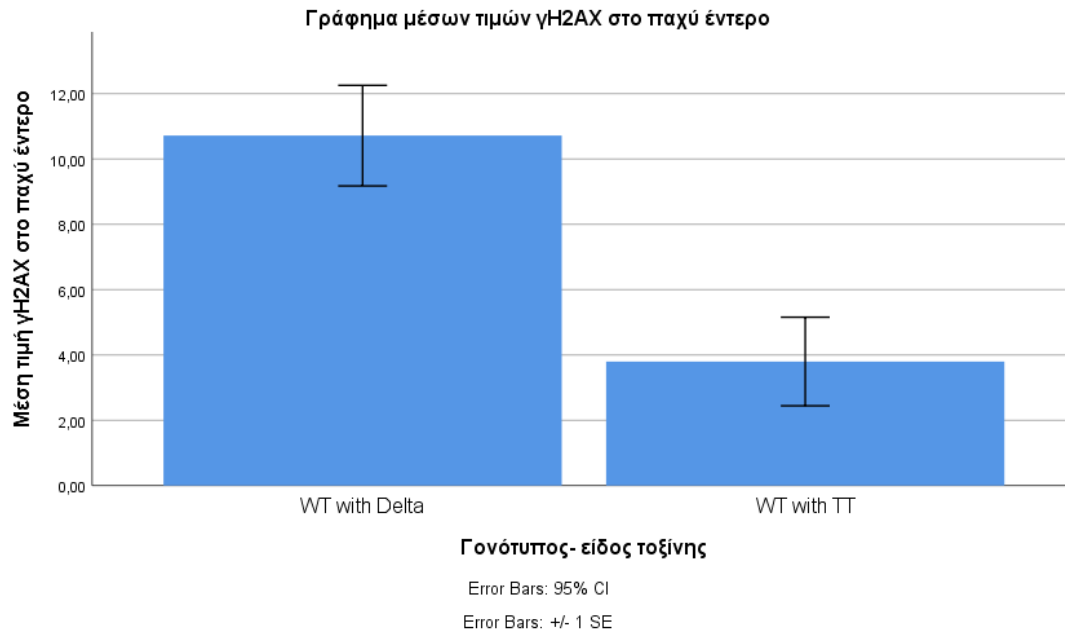


Φωτογραφία 11. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο ποντικών με γονότυπο p53+/- στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

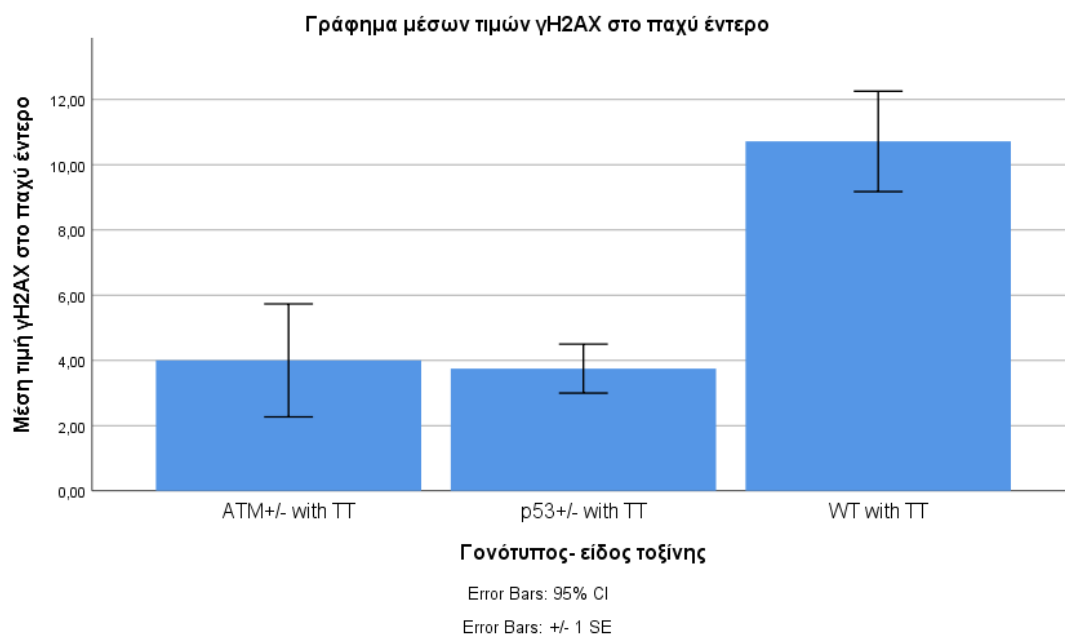


Φωτογραφία 12. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο λεπτό έντερο ποντικών με γονότυπο p53 KO στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

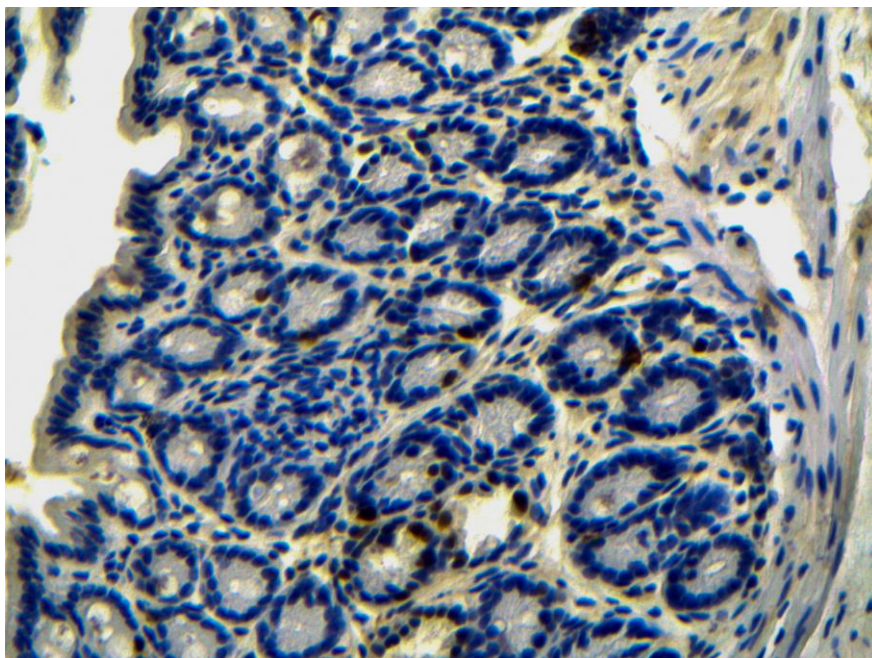
➤ Στο παχύ έντερο:



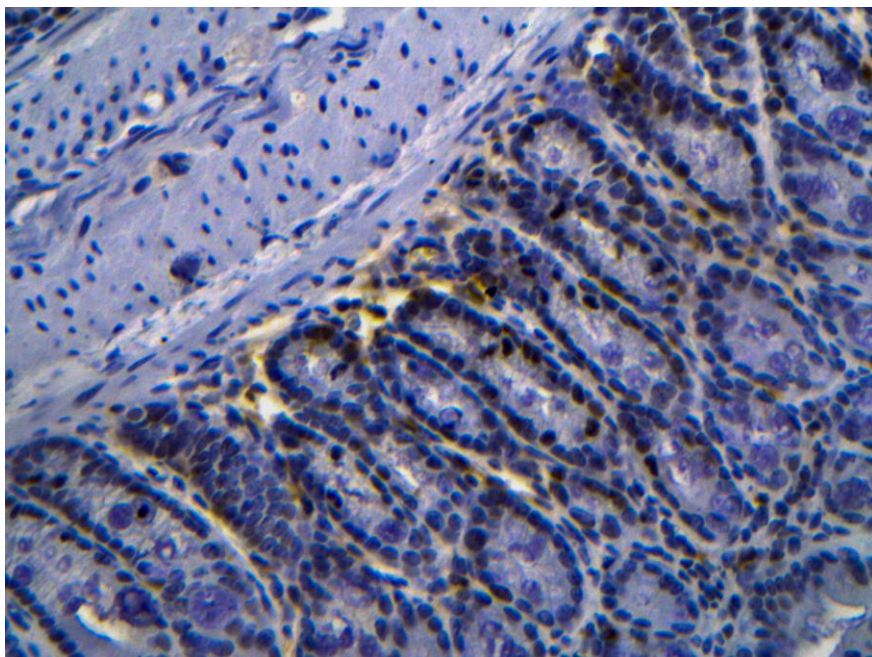
Γράφημα 3. Γράφημα μέσων τιμών γΗ2ΑΧ στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta και η TT μορφή της τοξίνης αντίστοιχα. Η διαφορά των μέσων τιμών βρέθηκε στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 0,05 μέσω Post Hoc tests (LSD).



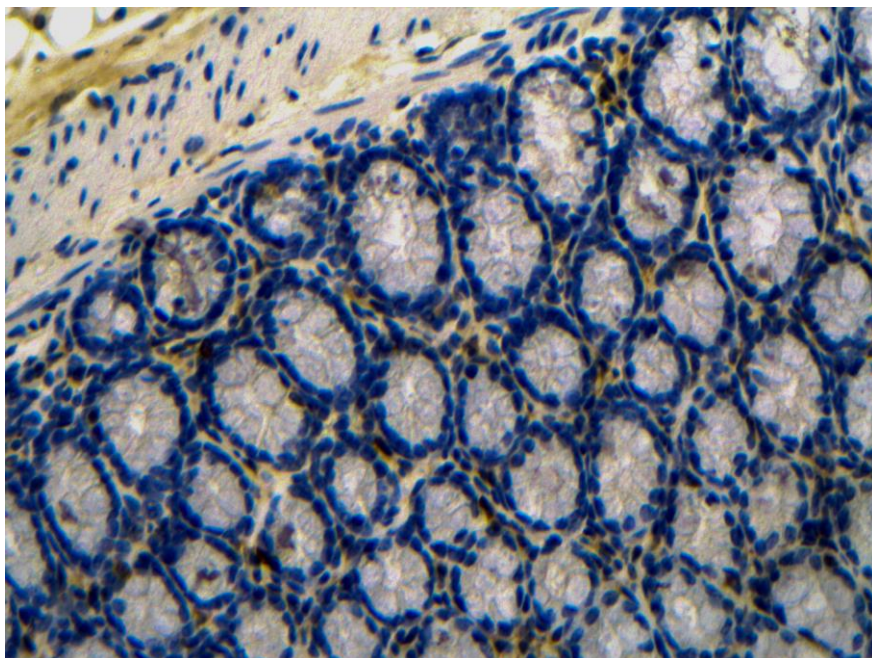
Γράφημα 4. Γράφημα μέσων τιμών του γΗ2ΑΧ στο παχύ έντερο ποντικών. Οι μέσες τιμές των ομάδων που περιλαμβάνονται στο γράφημα βρέθηκε να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο του 0,05 μέσω Post Hoc tests (LSD).



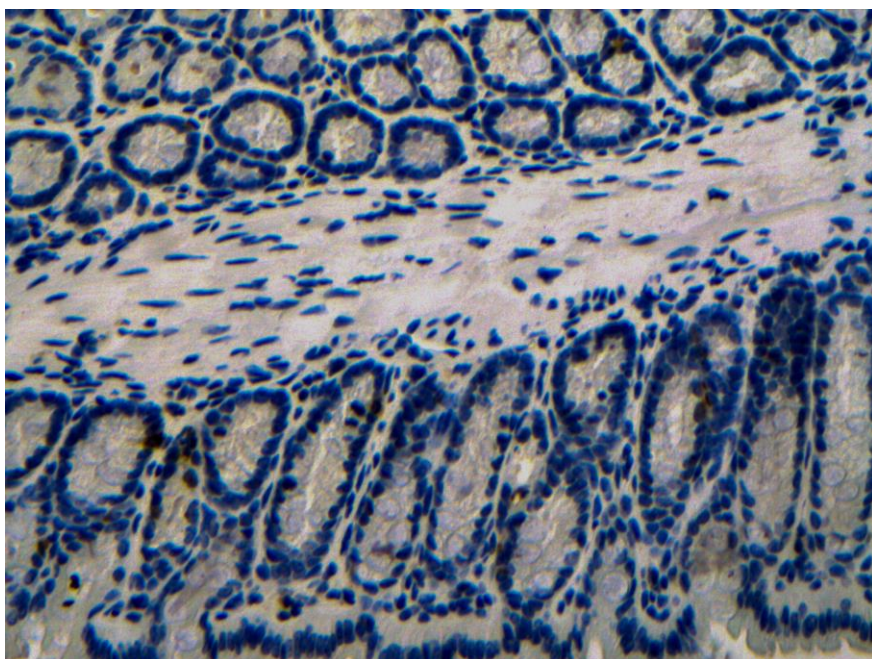
Φωτογραφία 13. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γ H2AX στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



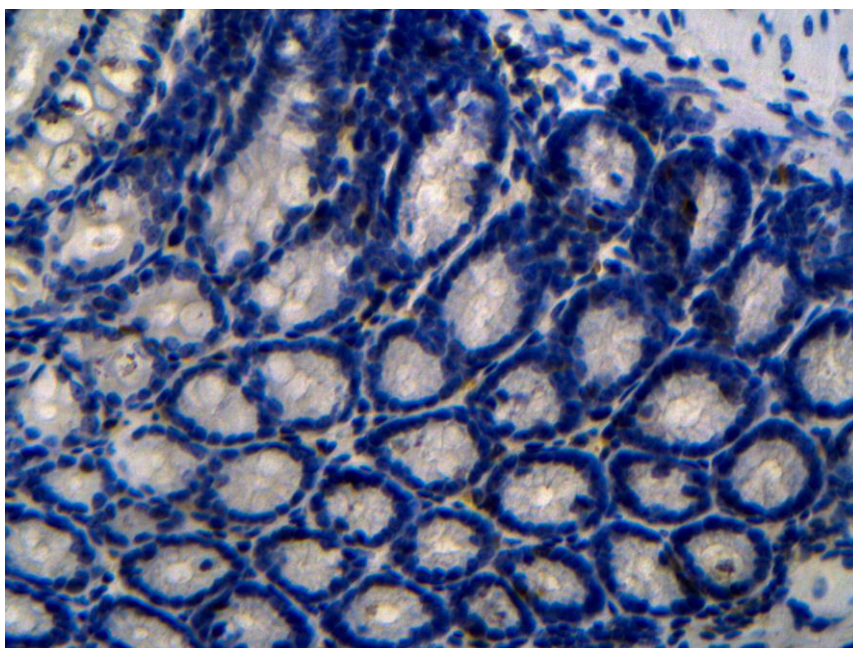
Φωτογραφία 14. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γ H2AX στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



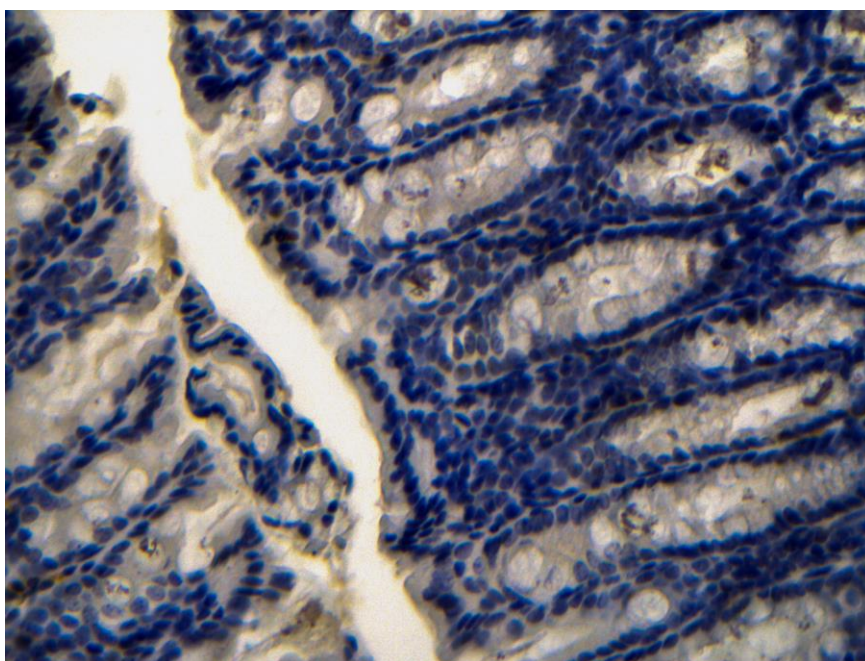
Φωτογραφία 15. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η TT μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



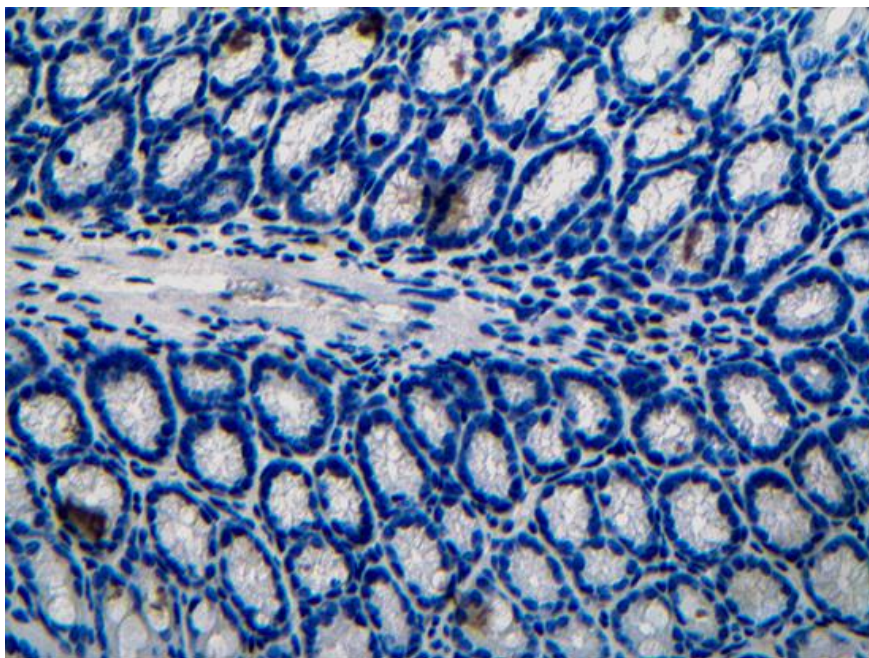
Φωτογραφία 16. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γH2AX στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η TT μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



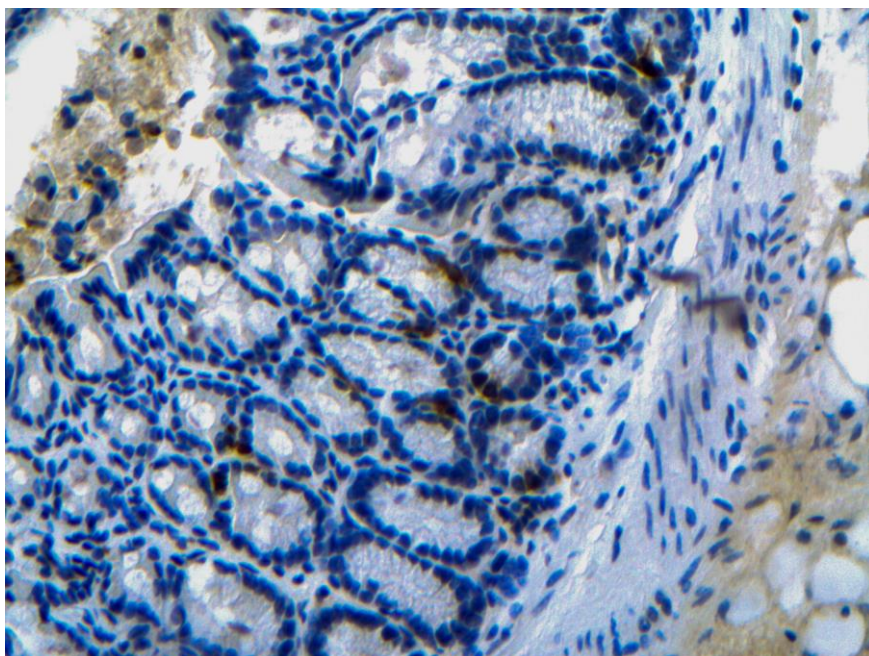
Φωτογραφία 17. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γ H2AX στο παχύ έντερο ποντικών με γονότυπο $p53+/-$ στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



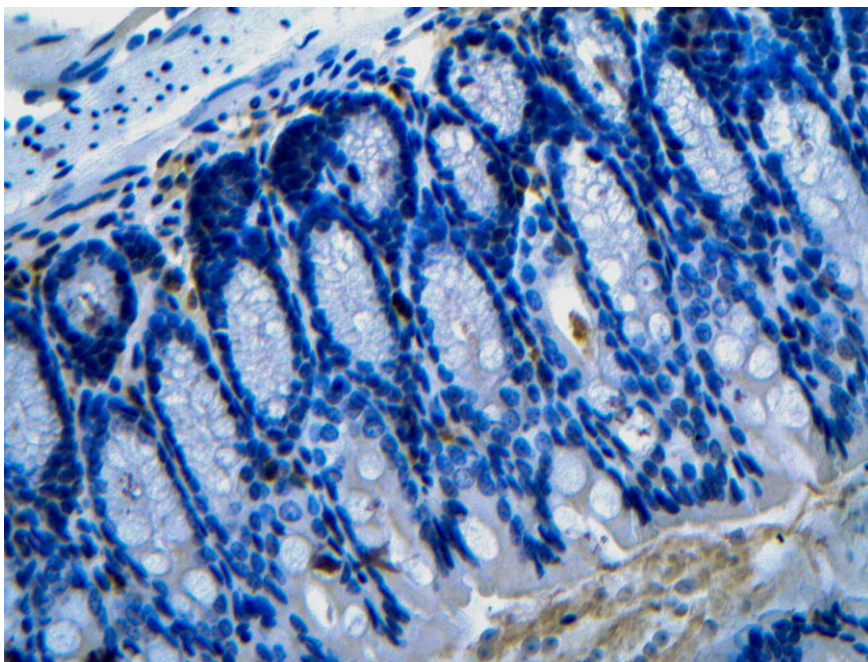
Φωτογραφία 18. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γ H2AX στο παχύ έντερο ποντικών με γονότυπο $p53+/-$ στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



Φωτογραφία 11. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γ H2AX στο παχύ έντερο ποντικών με γονότυπο $p53+/-$ στα οποία χορηγήθηκε η TT μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



Φωτογραφία 19. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γ H2AX στο παχύ έντερο ποντικών με γονότυπο $ATM+/-$ στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



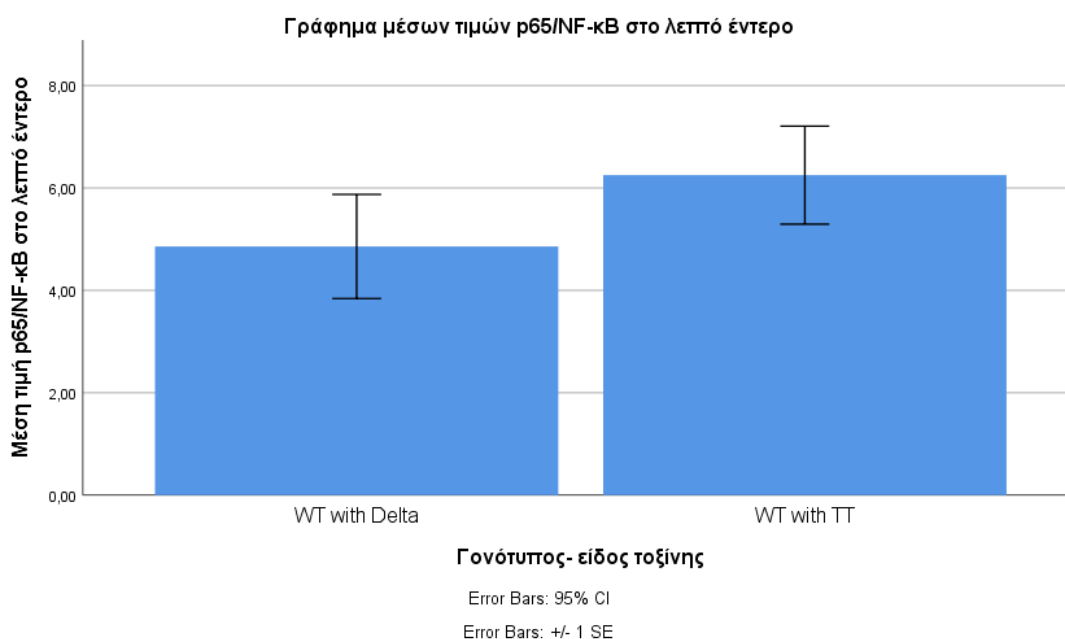
Φωτογραφία 20. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του γΗ2ΑΧ στο παχύ έντερο ποντικών με γονότυπο ΑΤΜ+/- στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

3.2.2 p65/ NF-κB

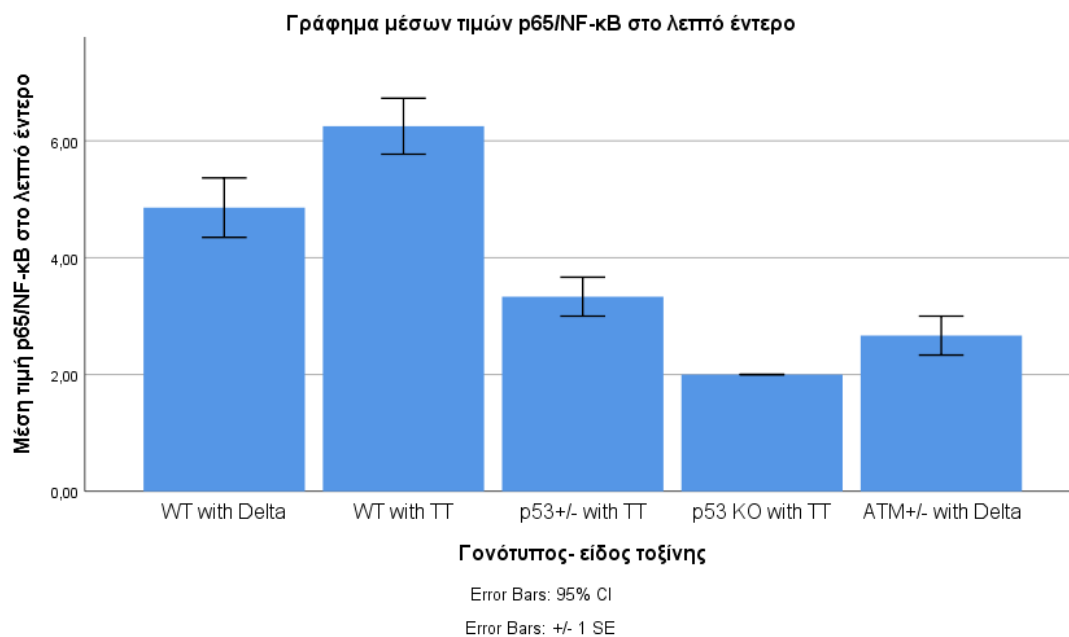
Δεδομένου ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι ο κύριος ρυθμιστής της φλεγμονής, προχωρήσαμε στη μελέτη της πυρηνικής έκφρασης της υπομονάδας p65, η οποία είναι η πιο συχνή στο δραστικό διμερές του NF-κB. Σημειώνεται ότι η παρουσία πυρηνικού σήματος υποδηλώνει την ενεργοποίηση του p65.

Στα γραφήματα που ακολουθούν παρατίθενται τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα της ανάλυσης των μέσων τιμών των μετρήσεων μέσω της ANOVA- Post Hoc tests (LSD) για το p65/NF-κB στο λεπτό και στο παχύ έντερο των επιμέρους γονοτύπων, στο επίπεδο του 0,05.

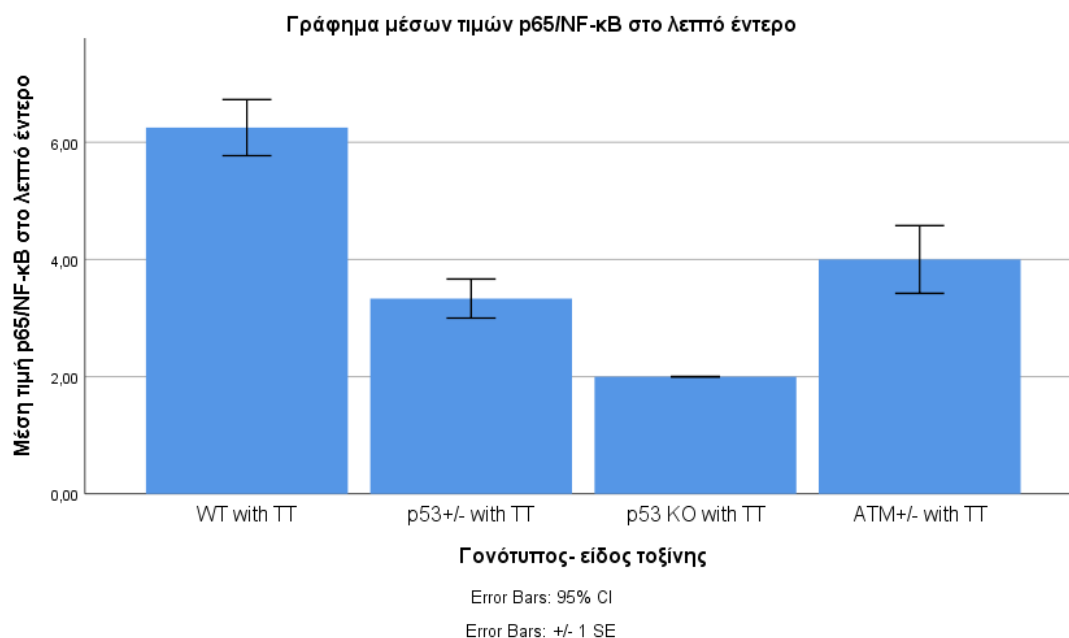
➤ Στο λεπτό έντερο:



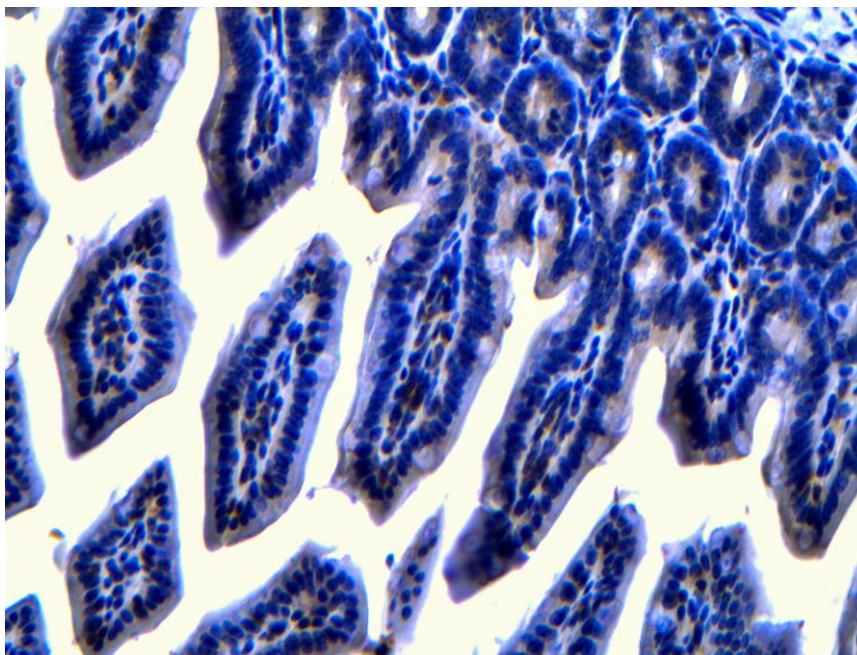
Γράφημα 5. Γράφημα μέσων τιμών p65/NF-κB στο λεπτό έντερο για τα WT ποντίκια με χορήγηση Delta ή TT τοξίνης. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,005.



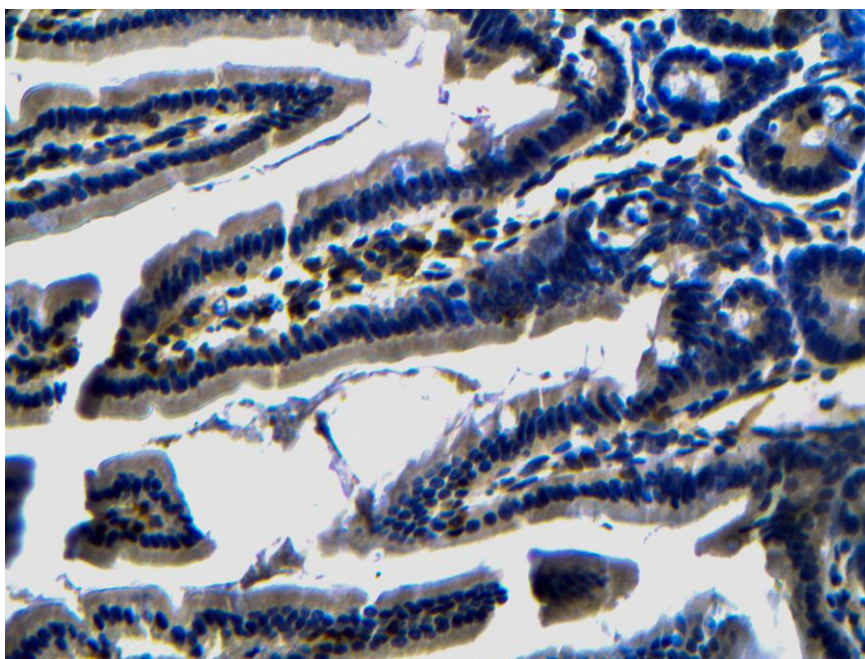
Γράφημα 6. Γράφημα μέσων τιμών p65/NF-κB στο λεπτό έντερο. Περιλαμβάνει τις ομάδες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μέση τιμή στο επίπεδο του 0,05 μέσω των Post Hoc tests (LSD).



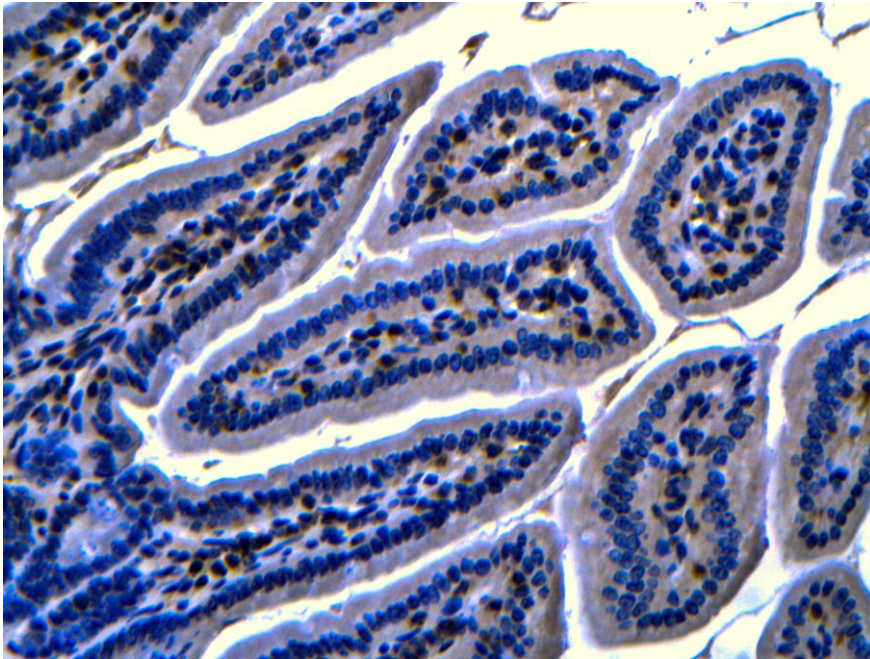
Γράφημα 7. Γράφημα μέσων τιμών του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο μετά από χορήγηση ενεργούς τοξίνης. Παρουσιάζονται οι ομάδες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μέση τιμή μετά από διεξαγωγή Post Hoc tests (LSD).



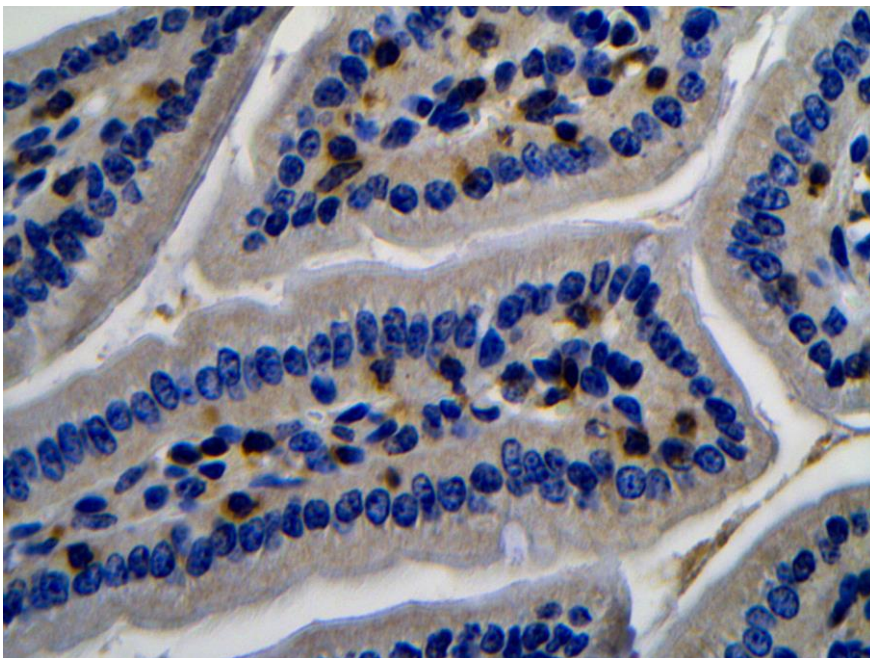
Φωτογραφία 21. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



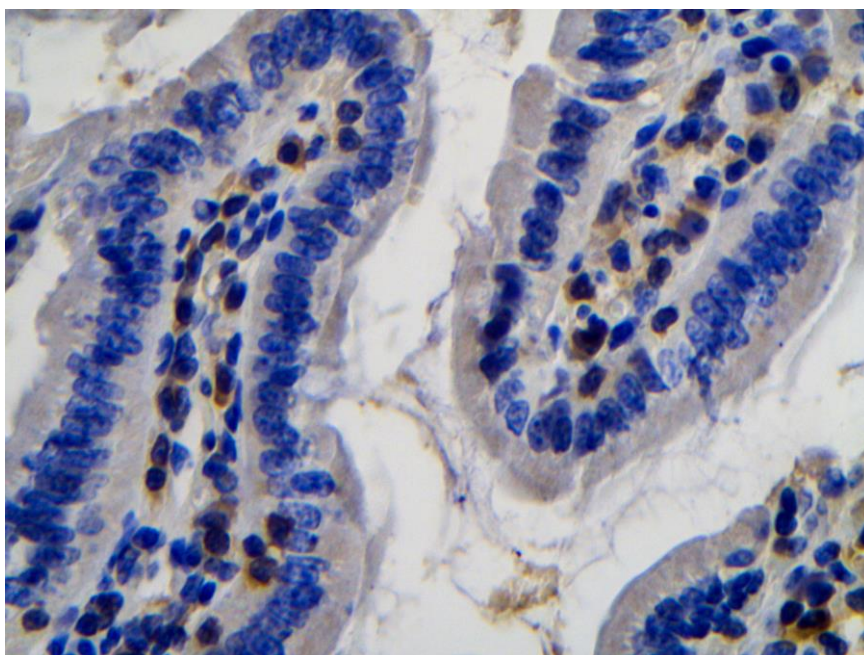
Φωτογραφία 22. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



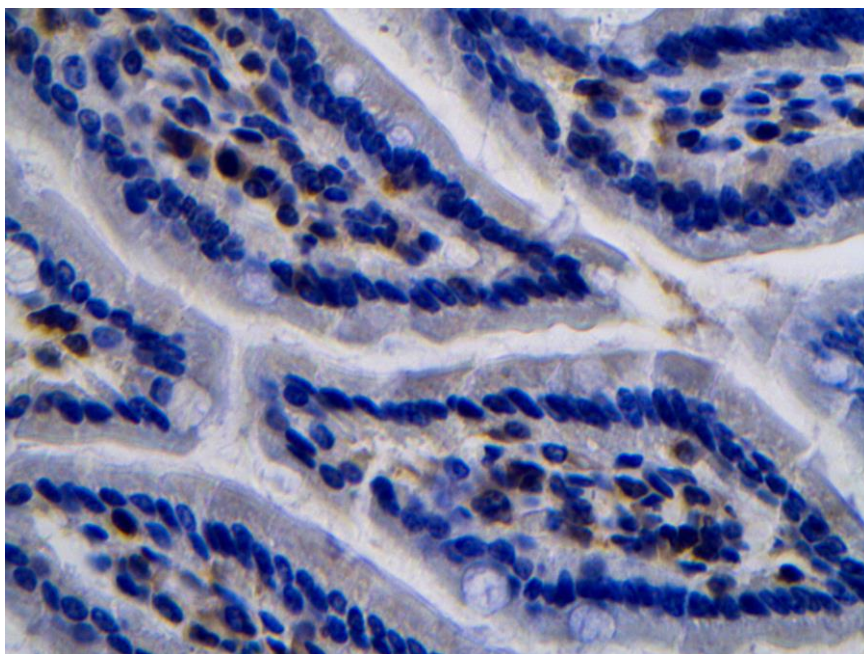
Φωτογραφία 23. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



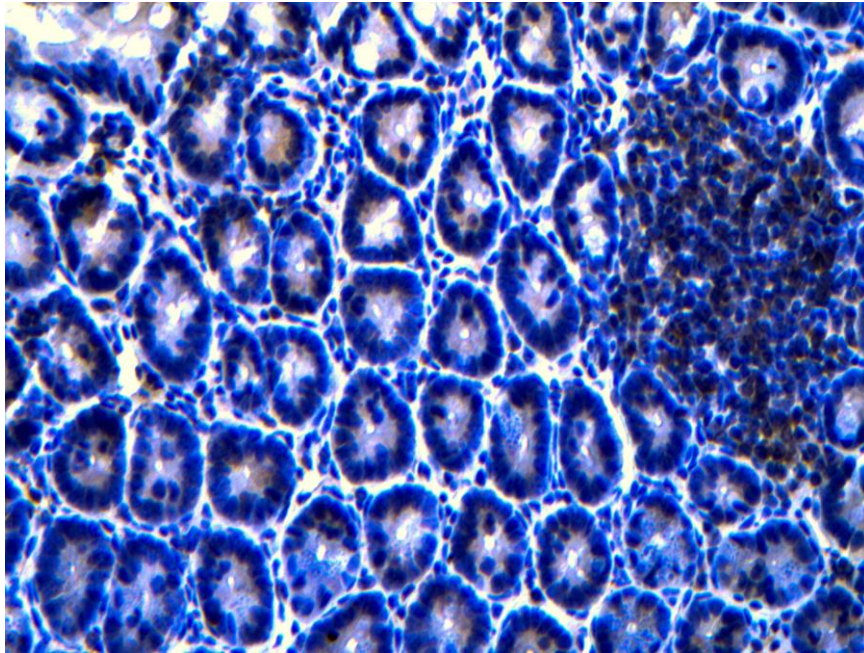
Φωτογραφία 24. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x.



Φωτογραφία 25. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο p53 KO ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x.

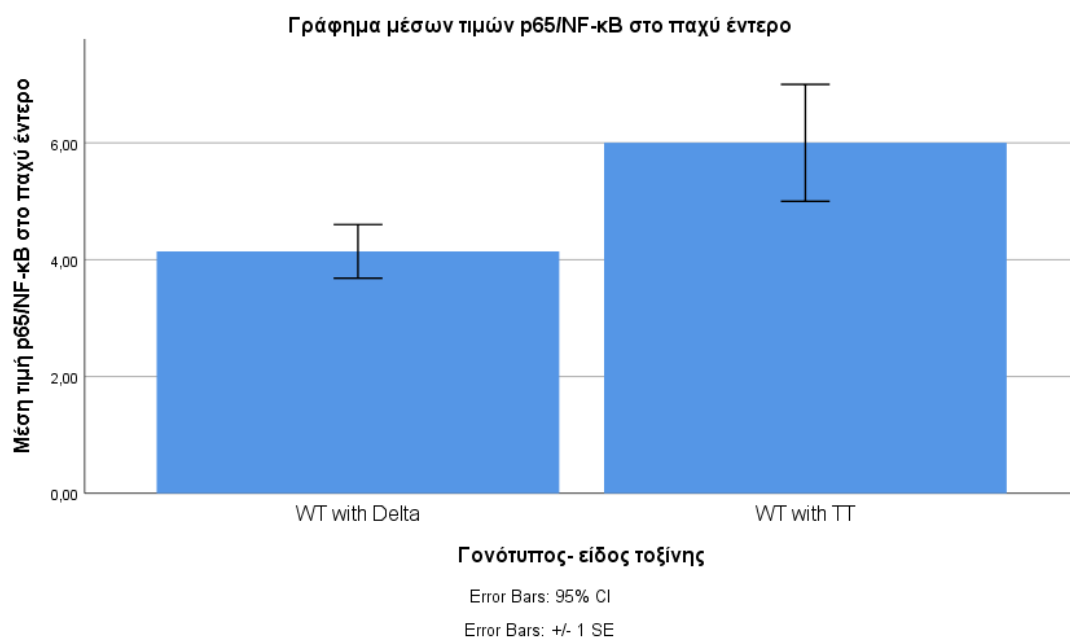


Φωτογραφία 26. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο p53+/- ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x.

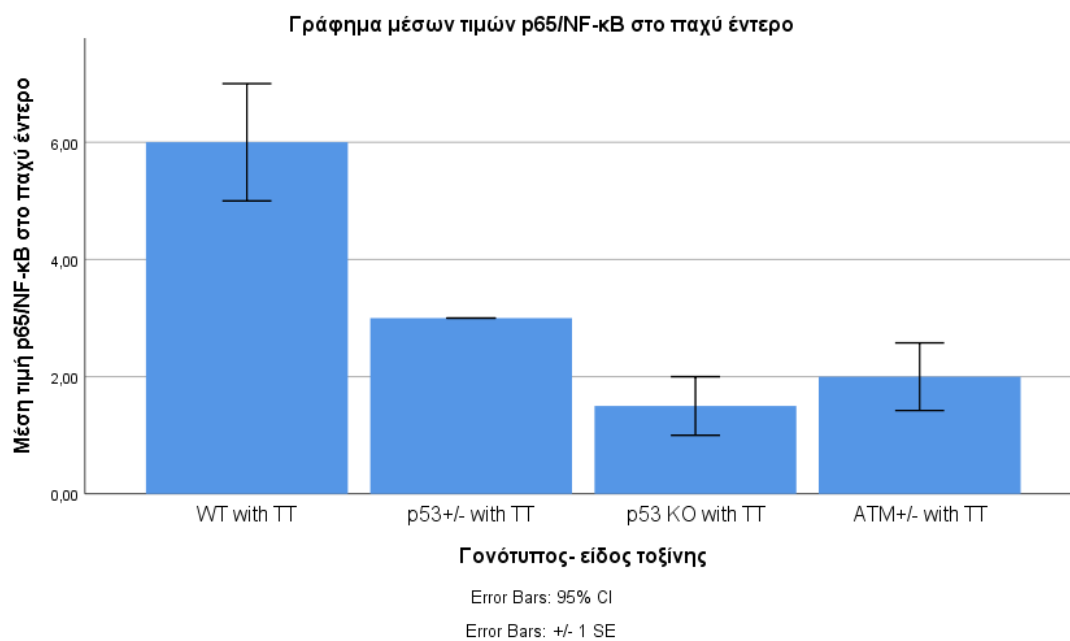


Φωτογραφία 27. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο λεπτό έντερο ATM+/- ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

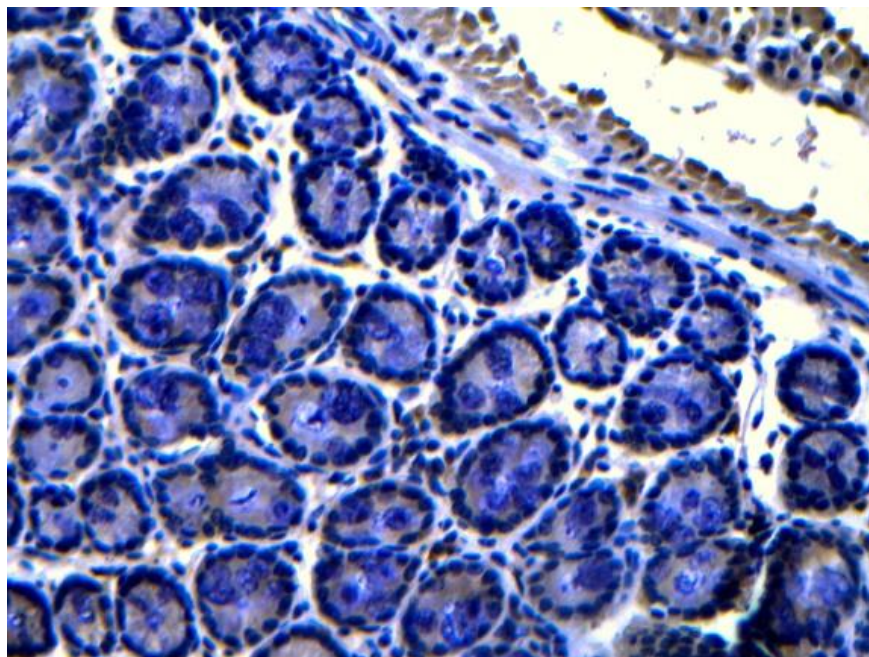
➤ Στο παχύ έντερο:



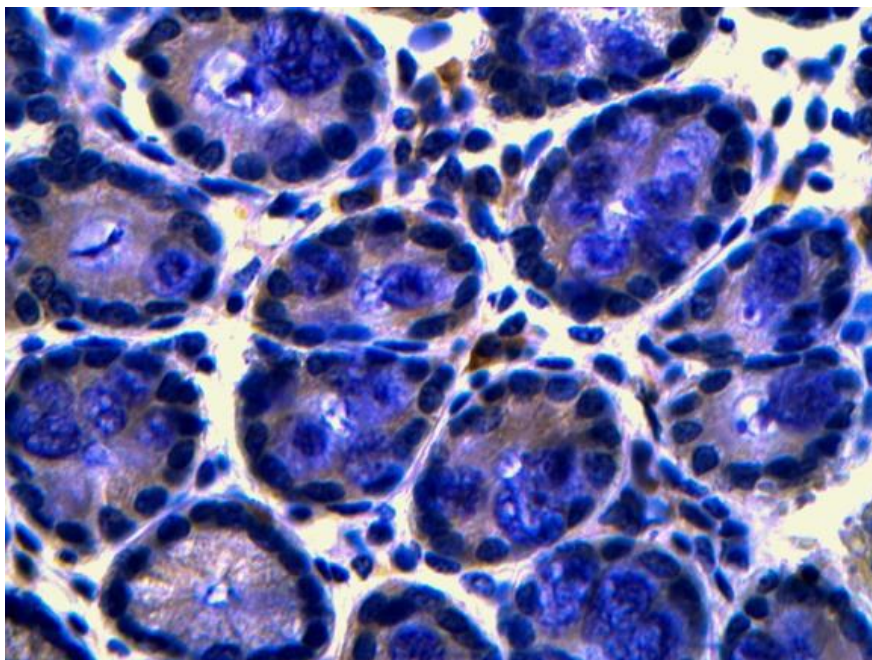
Γράφημα 8. Γράφημα μέσων τιμών για το δείκτη p65/NF-κB στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία έγινε χορήγηση Delta και TT μορφής της τοξίνης αντίστοιχα. Η διαφορά στις μέσες τιμές βρέθηκε στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 0,05 μέσω Post Hoc tests (LSD).



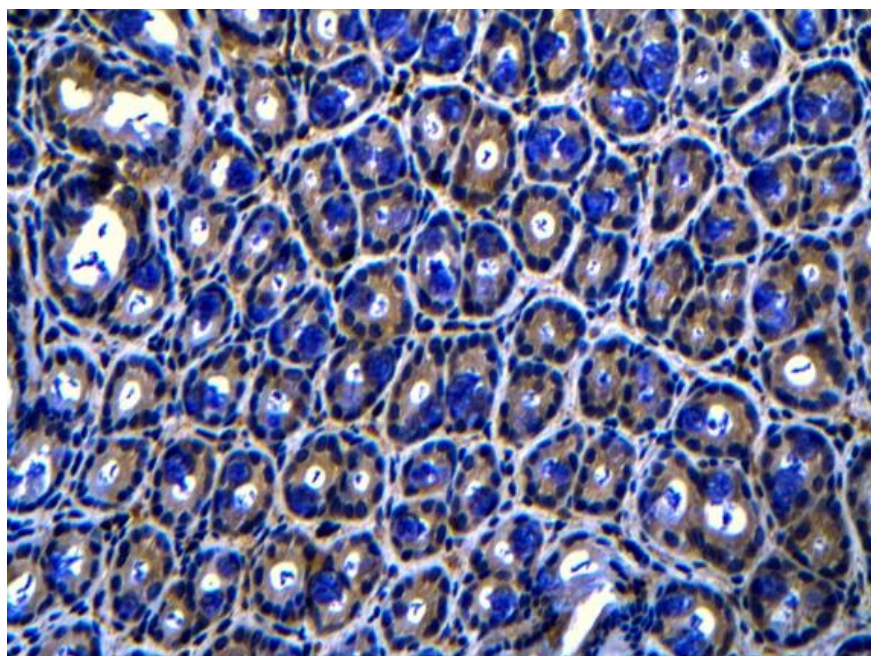
Γράφημα 9. Γράφημα μέσων τιμών για το p65/NF-κB στο παχύ έντερο ποντικών μετά από χορήγηση της ενεργού (TT) μορφής της τοξίνης. Η διαφορά των μέσων τιμών των γονοτύπων που αναπαρίστανται βρέθηκε στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 0,05 μέσω Post Hoc tests (LSD).



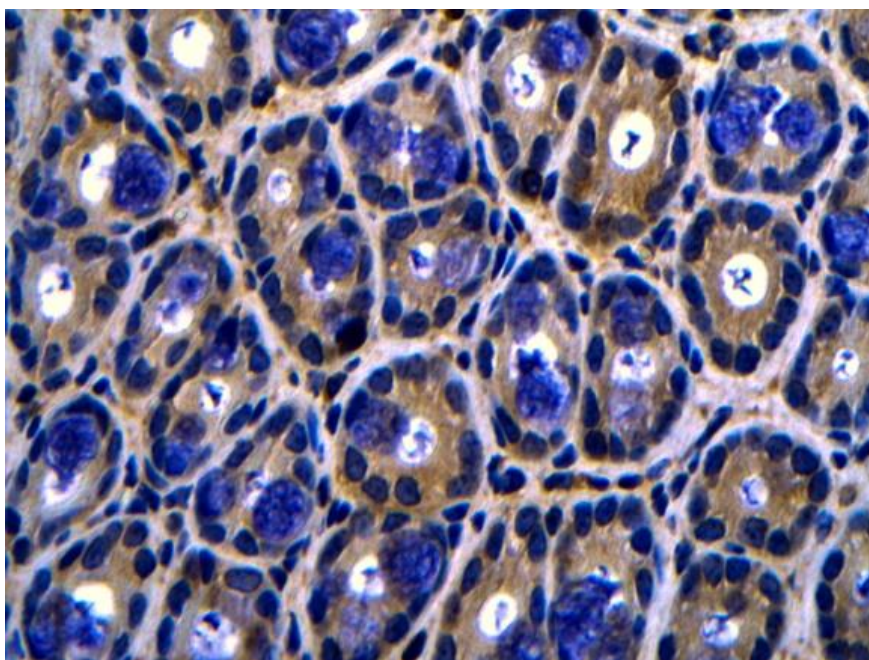
Φωτογραφία 28. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



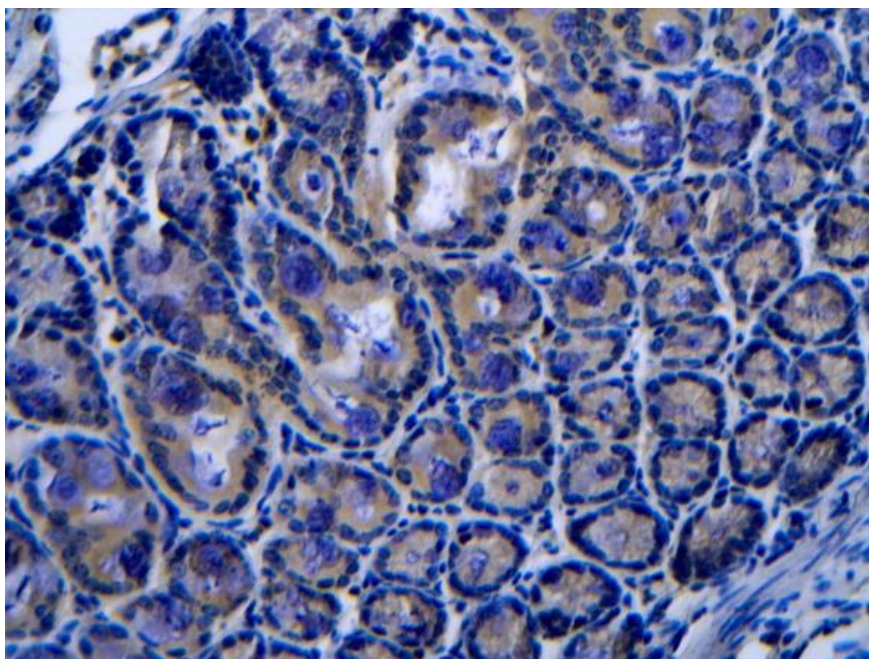
Φωτογραφία 29. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x.



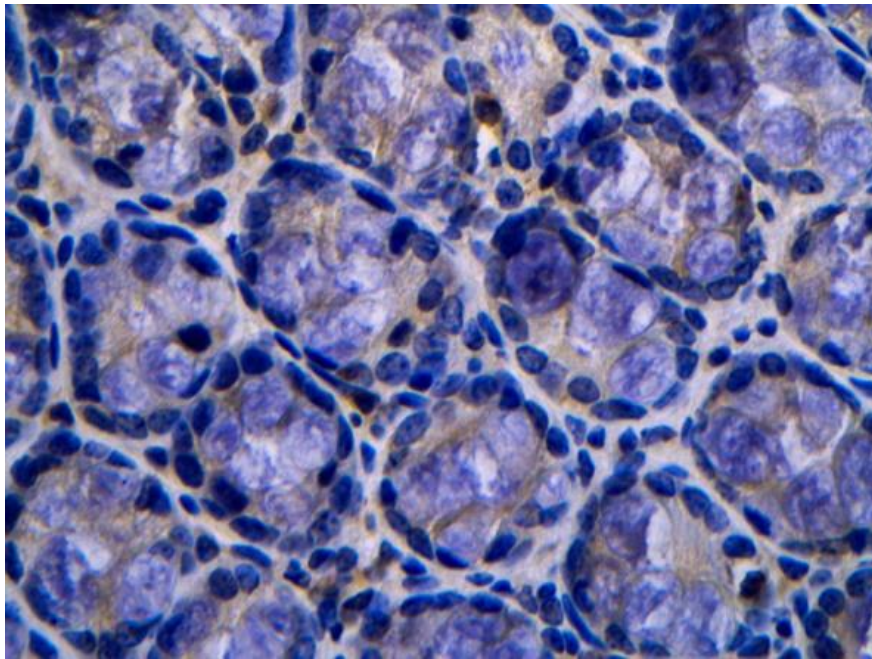
Φωτογραφία 30. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η TT μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



Φωτογραφία 31. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x .



Φωτογραφία 32. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο παχύ έντερο p53+/- ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

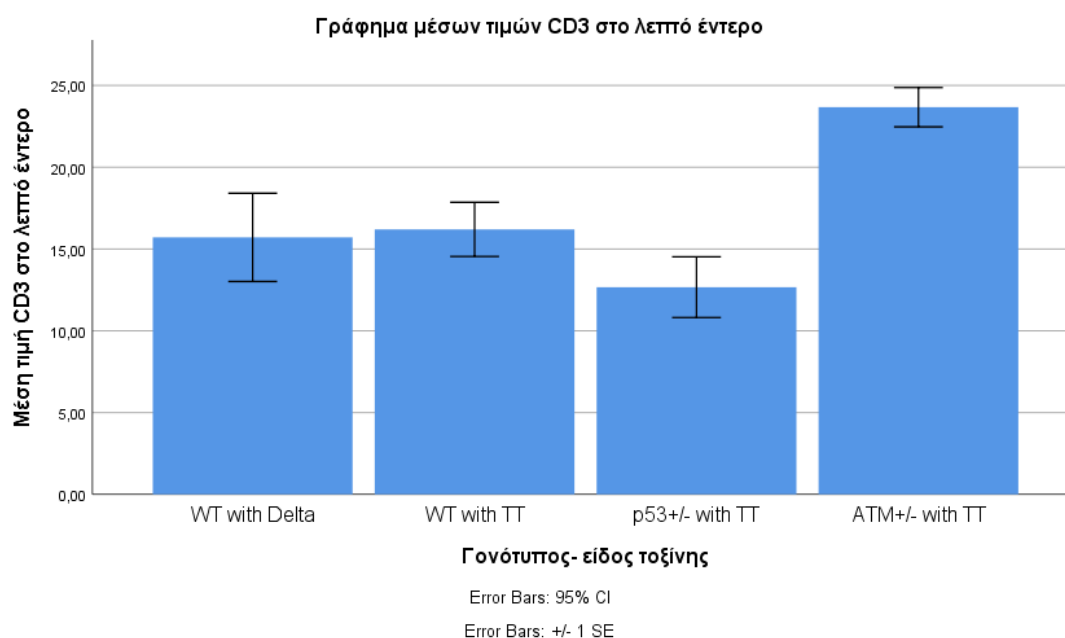


Φωτογραφία 33. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του p65/NF-κB στο παχύ έντερο p53 KO στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x.

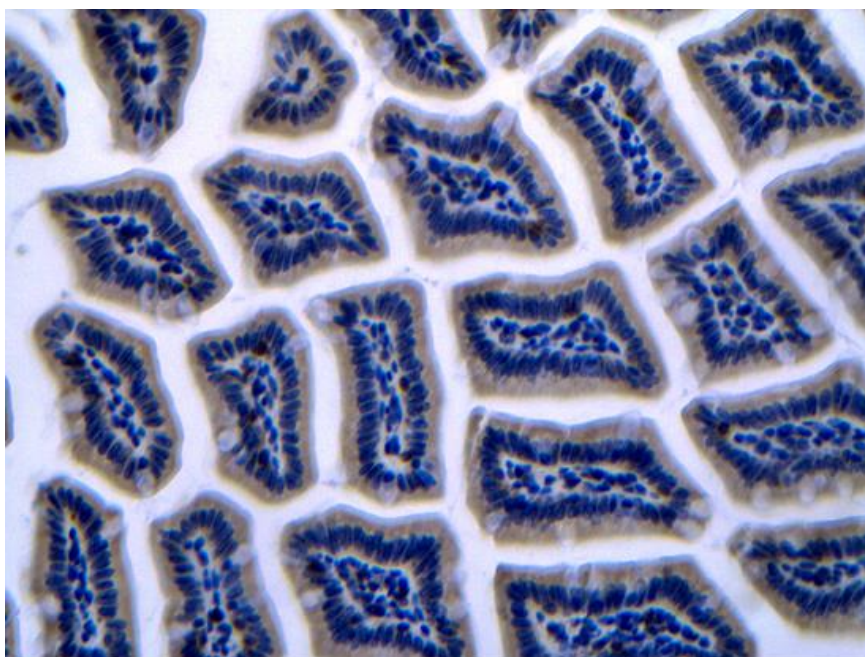
3.2.3 CD3 και B220/CD45R (Δείκτες T και B λεμφοκυττάρων αντίστοιχα)

Λαμβάνοντας υπόψιν τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του DDR μπορεί να κινητοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα (Pateras et al., 2015), προχωρήσαμε στην μελέτη δύο καθιερωμένων δεικτών για τα T και τα B λεμφοκύτταρα σε ποντίκια, το CD3 και το B220/CD45R, αντίστοιχα.

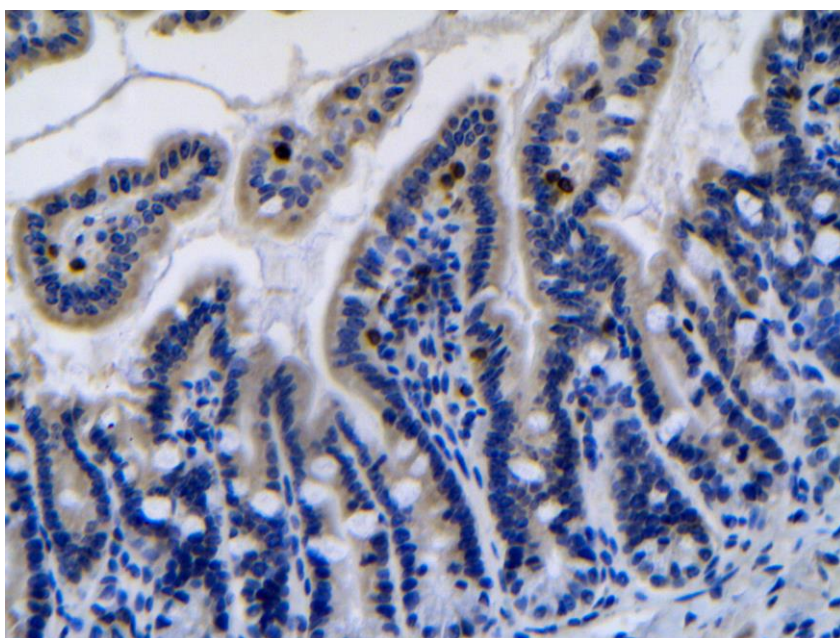
➤ CD3 στο λεπτό έντερο:



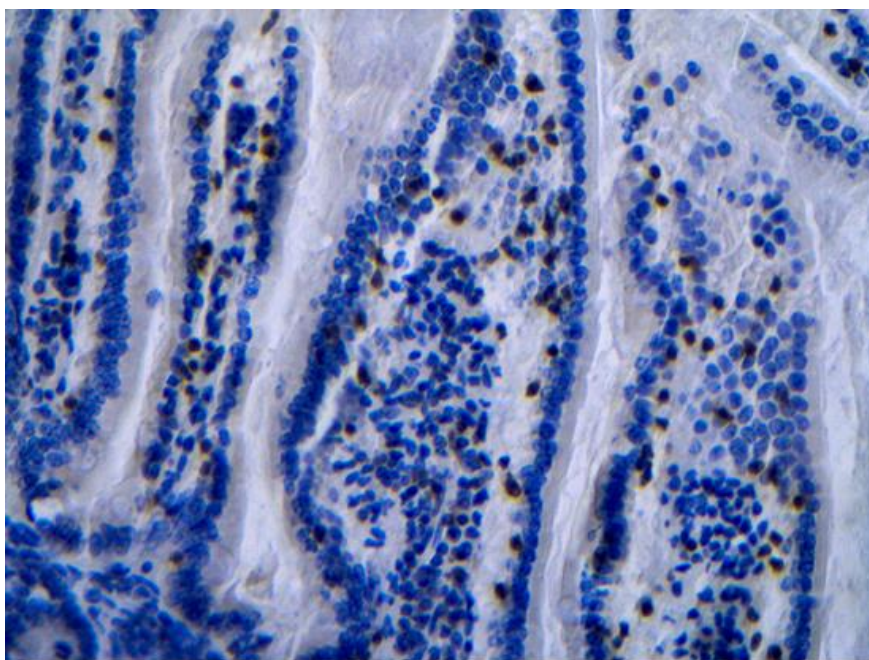
Γράφημα 10. Γράφημα μέσων τιμών CD3 στο λεπτό έντερο των ομάδων που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά τη μέση τιμή στο επίπεδο του 0,05, όπως προέκυψε από τη διεξαγωγή Post Hoc tests (LSD).



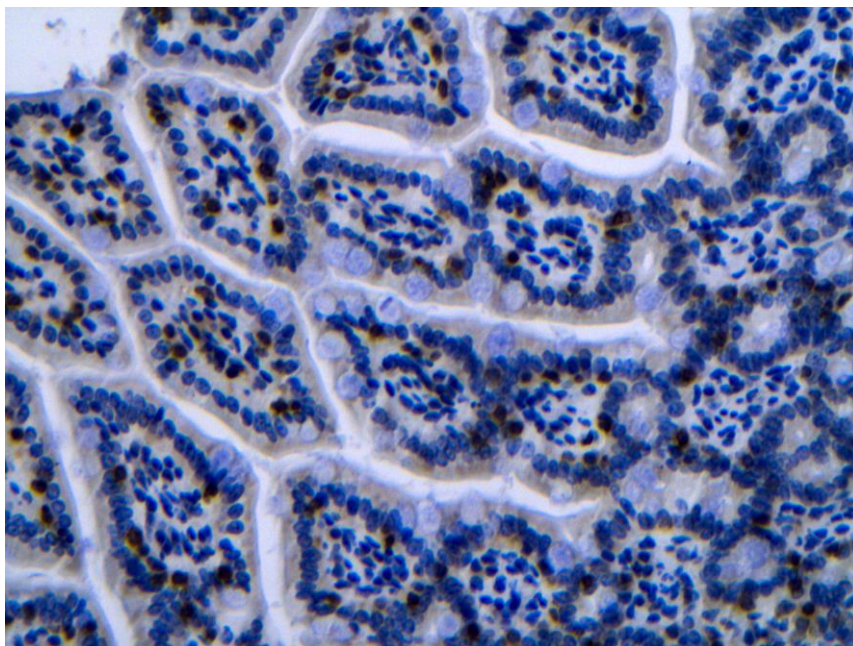
Φωτογραφία 34. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



Φωτογραφία 35. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η TT μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



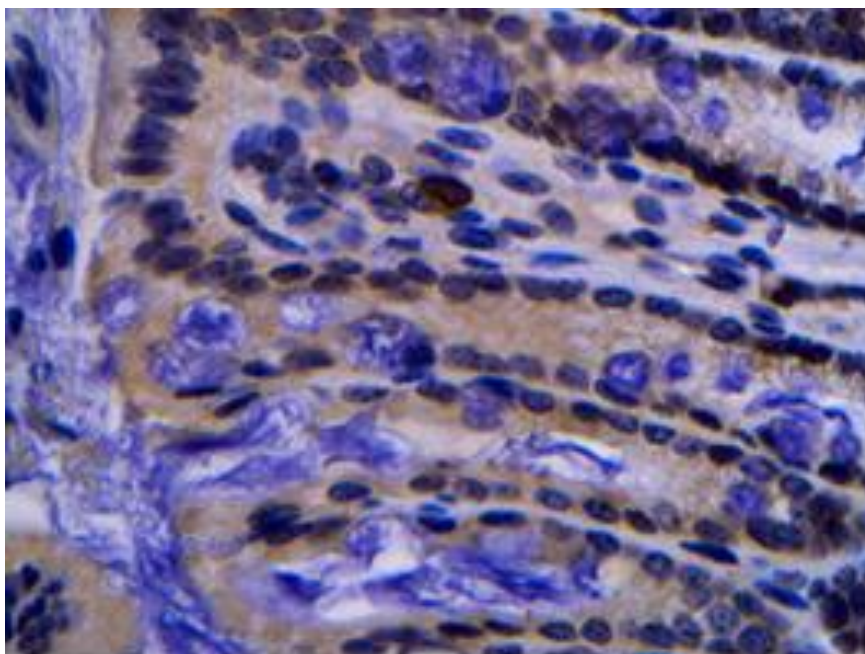
Φωτογραφία 36. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 στο λεπτό έντερο ποντικών με γονότυπο p53+/- στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



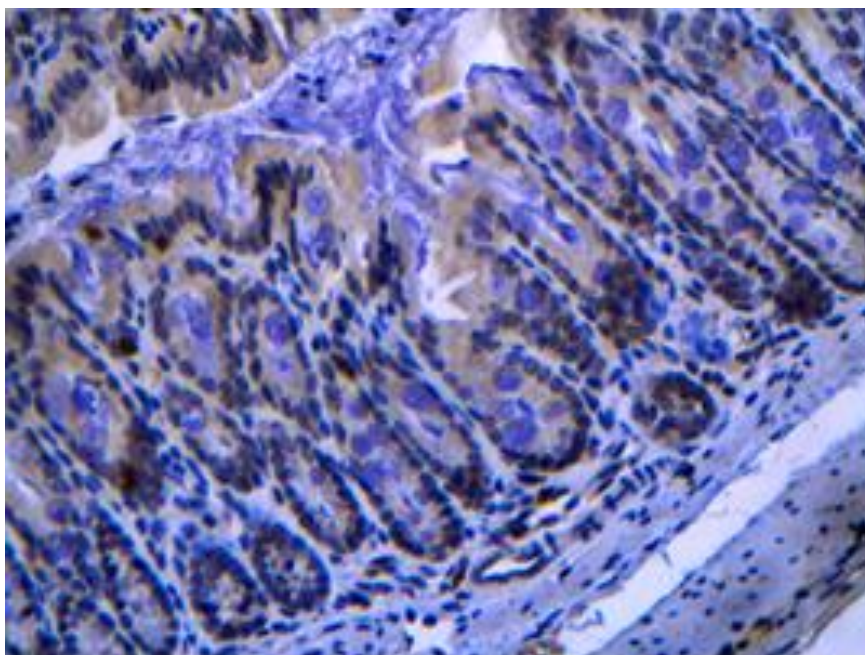
Φωτογραφία 37. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 στο λεπτό έντερο ποντικών με γονότυπο ATM +/- στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

➤ CD3 στο παχύ έντερο:

Δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές για το CD3 στο παχύ έντερο των επιμέρους γονοτύπων των ποντικών (στο επίπεδο του 0,05).



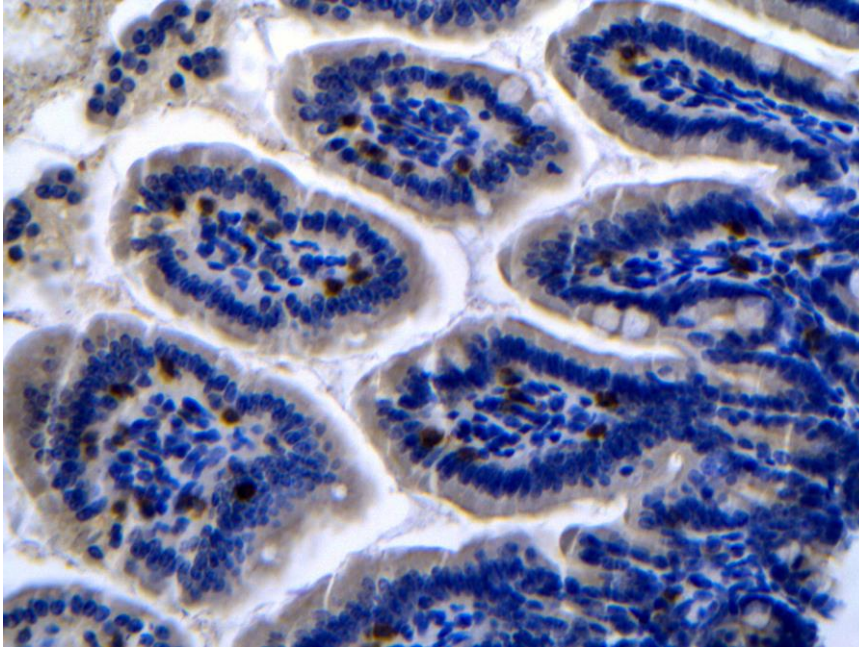
Φωτογραφία 38. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 στο παχύ έντερο ποντικών με γονότυπο ATM +/- στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



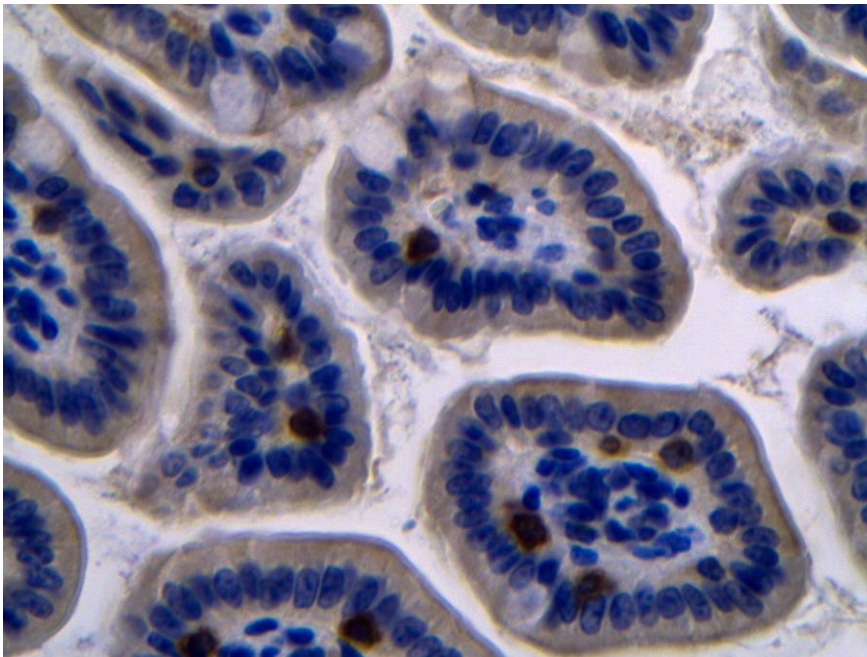
Φωτογραφία 39. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 στο παχύ έντερο ποντικών με γονότυπο ATM +/- στα οποία χορηγήθηκε η ΤΤ μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.

➤ B220/CD45R στο λεπτό έντερο:

Η διεξαγωγή Post Hoc tests (LSD) έδειξε πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του 0,05 για το B220/CD45R στο λεπτό έντερο των ποντικών μεταξύ των επιμέρους γονοτύπων.



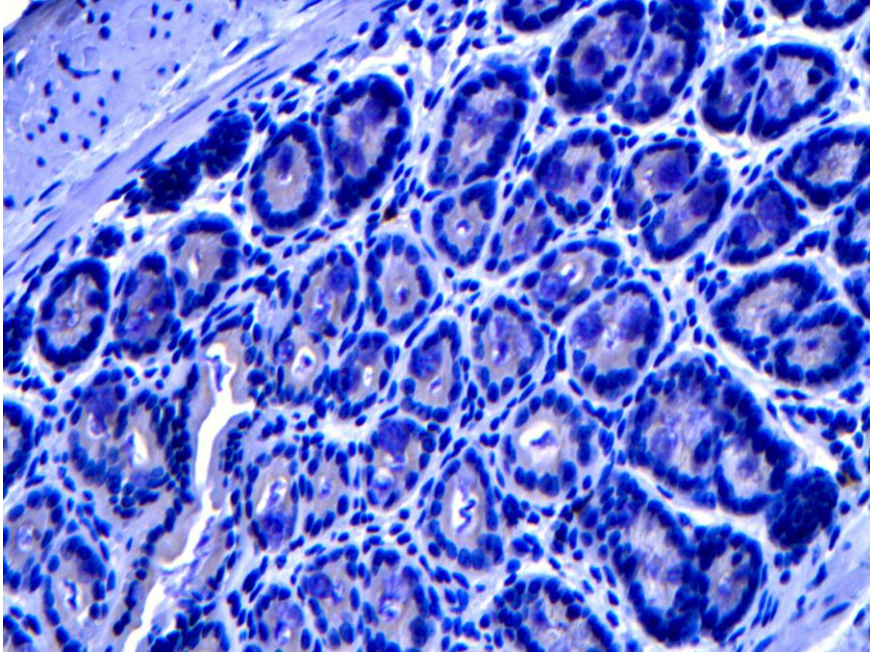
Φωτογραφία 40. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του B220/CD45R στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



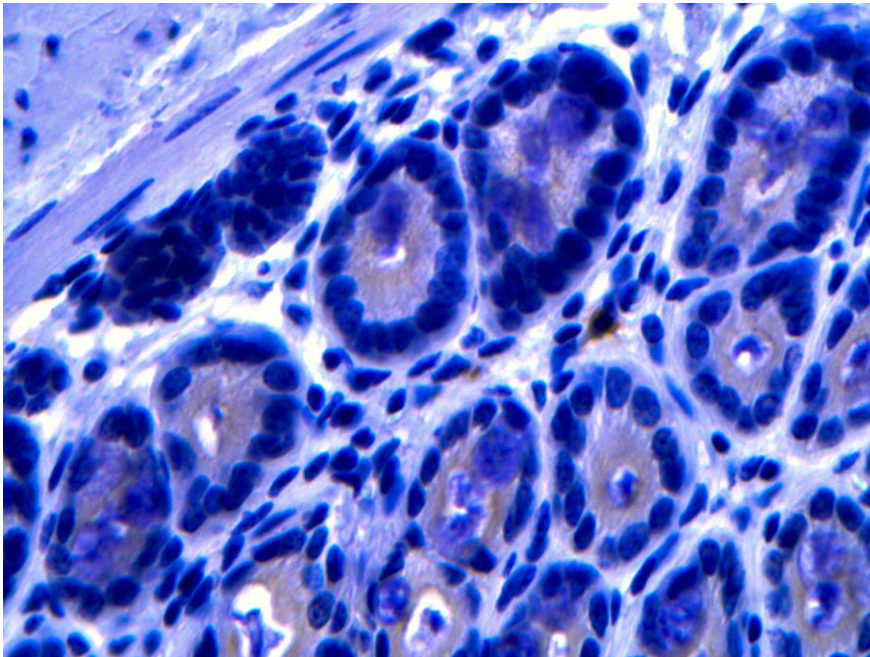
Φωτογραφία 41. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του B220/CD45R στο λεπτό έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x.

➤ B220/CD45R στο παχύ έντερο:

Η διεξαγωγή Post Hoc tests (LSD) έδειξε πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του 0,05 για το B220/CD45R στο λεπτό έντερο των ποντικών, σε κανέναν από τους επιμέρους γονοτύπους.



Φωτογραφία 42. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του B220/CD45R στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 200x.



Φωτογραφία 43. Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του B220/CD45R στο παχύ έντερο WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε η Delta μορφή της τοξίνης. Μεγέθυνση 400x.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μόλυνση των C57BL/6 ποντικών με το MC71 τροποποιημένο στέλεχος της *Salmonella Typhimurium* δια της τροφής είχε ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση των βακτηριακών στελεχών ενδοκυττάρια, τον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή είτε ενεργού (TT) είτε αδρανούς (Delta) μορφής τοξίνης. Στα ποντίκια πραγματοποιήθηκε ευθανασία 10 μέρες μετά τη μόλυνση (p.i., post infection).

Φυσιολογικά θα αναμέναμε, όπως στις περισσότερες βακτηριακές λοιμώξεις, να δούμε μέσω της ιστολογικής έκθεσης αύξηση στη βαρύτητα της φλεγμονής στα ποντίκια τα οποία μολύνθηκαν με το MC71-TT στέλεχος. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκε ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή αυξημένη φλεγμονή στα ποντίκια που μολύνθηκαν με το MC71-ΔcdtB στέλεχος. Η διαπίστωση αυτή έγινε για το λεπτό έντερο κυρίως, αλλά σε μικρότερο βαθμό και για το παχύ.

Τα ευρήματα της ιστολογικής ανάλυσης είναι σε συμφωνία με τα ερευνητικά αποτελέσματα των Del Bel Belluz et al. (Del Bel Belluz et al., 2016), οι οποίοι επίσης παρατήρησαν 10 μέρες μετά την έναρξη της λοίμωξης μείωση της βαρύτητας της φλεγμονής και των συμπτωμάτων της λοίμωξης σε θηλυκά 129S6/SvEvTac ποντίκια στα οποία διαπιστώθηκε η παραγωγή της TT τοξίνης, έναντι αυτών με την Delta.

Δεδομένου ότι η TT τοξίνη προκαλεί σπασίματα στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA, δρώντας όπως οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες, προχωρήσαμε στην μελέτη της ενεργοποίησης του μονοπατιού DDR εξετάζοντας ανοσοϊστοχημικά τα επίπεδα έκφρασης του δείκτη γH2AX. Τα επίπεδα γH2AX στα περιστατικά που μελετήσαμε ήταν στατιστικώς σημαντικά πιο αυξημένα τόσο στο λεπτό όσο και στο παχύ έντερο όπου χορηγήθηκε η αδρανής μορφή (Delta) συγκριτικά με περιστατικά όπου χορηγήθηκε η ενεργής μορφή (TT). Εκ πρώτης, το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται ότι έρχεται σε αντίθεση με τη δράση της τοξίνης, ωστόσο εάν λάβουμε υπ' όψιν το γεγονός ότι τα πρώτα περιστατικά (Delta) εμφάνιζαν μεγαλύτερη βαρύτητα φλεγμονής σε σχέση με τα δεύτερα (TT) αυτό μπορεί να εξηγήσει τα ευρήματά μας. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η ενεργός φλεγμονή, όπως αυτή που εμφανίζεται σε αρκετά περιστατικά που έλαβαν την αδρανή μορφή, προκαλεί βλάβες στο DNA και ενεργοποίηση του DDR (Aivaliotis et al., 2012). Επιπλέον τα επίπεδα γH2AX στο παχύ έντερο των WT ποντικών που έλαβαν την αδρανή μορφή της τοξίνης ήταν σημαντικά υψηλότερα από τους ποντικούς με ετερόζυγο *p53* και χωριστά με ετερόζυγο *ATM*. Αυτό παρατηρήθηκε ανεξάρτητα από το εάν έλαβαν την αδρανή ή την ενεργή μορφή της τοξίνης. Αυτό μπορεί ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι η ATM συμμετέχει η ίδια

στην φωσφορυλίωση της H2AX, επομένως η μερική έλλειψή της, μπορεί εν δυνάμει να μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της H2AX. Όσον αφορά το αποτέλεσμα με την μερική έλλειψη του p53, ακόμα και αν το p53 αποτελεί καθοδικό τελεστή του DDR, αυτό το εύρημα χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Αναφορικά με τα επίπεδα του πυρηνικού σήματος του παράγοντα p65/NF-κB, παρατηρήσαμε στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα, τόσο στο λεπτό όσο και στο παχύ έντερο, στα WT ποντίκια που έλαβαν την αδρανή τοξίνη έναντι των ποντικών που έλαβαν ενεργή μορφή της τοξίνης. Το τελευταίο εύρημα, είναι ιδιαίτερο σημαντικό και χρήζει και αυτό περαιτέρω μελέτης προκειμένου να διευκρινισθεί ο υποκείμενος μηχανισμός. Βέβαια πρέπει να έχουμε υπόψιν μας ότι ο μικρός αριθμός των δειγμάτων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας είναι ημιποσοτική μέθοδος αποτελούν σημαντικούς περιορισμούς στην μελέτη μας και οπωσδήποτε απαιτούνται ποσοτικές μετρήσεις.

Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία (Pateras et al., 2015) ότι οι βλάβες στο DNA μπορούν εν δυνάμει να κινητοποιήσουν το ανοσοποιητικό, προχωρήσαμε στην μελέτη των επιπέδων έκφρασης του CD3 και του B220/CD45R που αποτελούν δείκτες που εκφράζονται από τα T και B λεμφοκύτταρα αντίστοιχα στα ποντίκια. Παρατηρήσαμε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο δείκτη CD3 στα ετερόζυγα για ATM ποντίκια που έλαβαν την ενεργό TT τοξίνη, έναντι των ποντικών με γονότυπο WT που έλαβαν είτε την ενεργό είτε την αδρανή τοξίνη και έναντι των p53 ετερόζυγων με την TT τοξίνη. Περαιτέρω ανάλυση απαιτείται κι εδώ, ώστε να μπορούν να εξαχθούν με ασφάλεια κάποια συμπεράσματα, γνωρίζοντας φυσικά πως η τυφοειδής τοξίνη έχει δειχθεί να έχει ανοσορρυθμιστικό ρόλο και για την ακρίβεια, μειώνει τη βαρύτητα της φλεγμονής στο έντερο, εγκαθιδρύοντας όμως ένα φαινότυπο ήπιας χρόνιας φλεγμονής.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία της τυφοειδούς τοξίνης επηρεάζει την ομοιοστασία του εντέρου. Απαιτούνται περαιτέρω αναλύσεις προκειμένου να ρίξουμε φως στους υποκείμενους μηχανισμούς. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι η συγκεκριμένη τοξίνη προκαλεί βλάβες στο γενετικό υλικό και με βάση πρόσφατες μελέτες που συνδέουν προηγούμενη λοίμωξη από τη *Salmonella* με αυξημένη επίπτωση καρκίνου στο παχύ έντερο, είναι σημαντικό να απαντήσουμε ποιες είναι οι επιδράσεις τη συγκεκριμένης τοξίνης σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggarwal, Bharat B., Ajaikumar B. Kunnumakkara, Kuzhuvelil B. Harikumar, Shan R. Gupta, Sheeja T. Tharakan, Cemile Koca, Sanjit Dey, and Bokyoung Sung. 2009. "Signal Transducer and Activator of Transcription-3, Inflammation, and Cancer." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171 (1): 59–76. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04911.x.
- Aggarwal, Bharat B. 2004. "Nuclear Factor-KappaB: The Enemy Within." *Cancer Cell* 6 (3): 203–8. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.003.
- Aivaliotis, Ioannis L., Ioannis S. Pateras, Marilena Papaioannou, Christina Glytsou, Konstantinos Kontzoglou, Elizabeth O. Johnson, and Vassilis Zoumpourlis. 2012. "How Do Cytokines Trigger Genomic Instability?" *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1–12. doi:10.1155/2012/536761.
- Anand, Preetha, Ajaikumar B. Kunnumakara, Chitra Sundaram, Kuzhuvelil B. Harikumar, Sheeja T. Tharakan, Oiki S. Lai, Bokyoung Sung, and Bharat B. Aggarwal. 2008. "Cancer Is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes." *Pharmaceutical Research* 25 (9): 2097–2116. doi:10.1007/s11095-008-9661-9.
- Anisimov, Vladimir N., Ewa Sikora, and Graham Pawelec. 2009. "Relationships between Cancer and Aging: A Multilevel Approach." *Biogerontology* 10 (4): 323–38. doi:10.1007/s10522-008-9209-8.
- Armstrong, Heather, Michael Bording-Jorgensen, Stephanie Dijk, and Eytan Wine. 2018. "The Complex Interplay between Chronic Inflammation, the Microbiome, and Cancer: Understanding Disease Progression and What We Can Do to Prevent It." *Cancers* 10 (3): 1–29. doi:10.3390/cancers10030083.
- Aylon, Yael, and Moshe Oren. 2011. "New Plays in the P53 Theater." *Current Opinion in Genetics and Development* 21 (1). Elsevier Ltd: 86–92. doi:10.1016/j.gde.2010.10.002.
- Balkwill, F, and A Mantovani. 2001. "Inflammation and Cancer: Back to Virchow?" *Lancet (London, England)* 357 (9255): 539–45. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
- Balkwill, Frances, Kellie A. Charles, and Alberto Mantovani. 2005. "Smoldering and Polarized Inflammation in the Initiation and Promotion of Malignant Disease." *Cancer Cell* 7 (3):

211–17. doi:10.1016/j.ccr.2005.02.013.

- Bartkova, Jirina, Christopher J Bakkenist, Ewa Rajpert-De Meyts, Niels E Skakkebaek, Maxwell Sehested, Jiri Lukas, Michael B Kastan, and Jiri Bartek. 2005. "ATM Activation in Normal Human Tissues and Testicular Cancer." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (6): 838–45. doi:10.4161/cc.4.6.1742.
- Bartkova, Jirina, Zuzana Hořejší, Karen Koed, Alwin Krämer, Frederic Tort, Karsten Zieger, Per Guldberg, et al. 2005. "DNA Damage Response as a Candidate Anti-Cancer Barrier in Early Human Tumorigenesis." *Nature* 434 (7035): 864–70. doi:10.1038/nature03482.
- Beatty, Gregory L, and Whitney L Gladney. 2015. "Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (4): 687–92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1860.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, R Siegel, Lindsey Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Journal for Clinicians* 00 (00): 1–31. doi:10.3322/caac.21492.
- Cardiff, Robert D, Claramae H Miller, and Robert J Munn. 2014. "Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections." *Cold Spring Harbor Protocols* 2014 (6): 655–58. doi:10.1101/pdb.prot073411.
- Chiang, Anne C, and Joan Massagué. 2008. "Molecular Basis of Metastasis." *The New England Journal of Medicine* 359 (26): 2814–23. doi:10.1056/NEJMra0805239.
- Cho, Eunyong, Stephanie A Smith-Warner, John Ritz, Piet A van den Brandt, Graham A Colditz, Aaron R Folsom, Jo L Freudenheim, et al. 2004. "Alcohol Intake and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 8 Cohort Studies." *Annals of Internal Medicine* 140 (8): 603–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096331>.
- Chovatiya, Raj, and Ruslan Medzhitov. 2014. "Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis." *Molecular Cell* 54 (2): 281–88. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.030.
- Cohen, S. M., and L. L. Arnold. 2011. "Chemical Carcinogenesis." *Toxicological Sciences* 120 (Supplement 1): S76–92. doi:10.1093/toxsci/kfq365.
- Colas, Chrystelle, Florence Coulet, Magali Svrcek, Ada Collura, Jean-François Fléjou, Alex

- Duval, and Richard Hamelin. 2012. "Lynch or Not Lynch? Is That Always a Question?" *Advances in Cancer Research* 113: 121–66. doi:10.1016/B978-0-12-394280-7.00004-X.
- Colotta, Francesco, Paola Allavena, Antonio Sica, Cecilia Garlanda, and Alberto Mantovani. 2009. "Cancer-Related Inflammation, the Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability." *Carcinogenesis* 30 (7): 1073–81. doi:10.1093/carcin/bgp127.
- Cooks, Tomer, Ioannis S Pateras, Ohad Tarcic, Hilla Solomon, Aaron J Schetter, Sylvia Wilder, Guillermina Lozano, et al. 2013. "Mutant P53 Prolongs NF-KB Activation and Promotes Chronic Inflammation and Inflammation-Associated Colorectal Cancer." *Cancer Cell* 23 (5): 634–46. doi:10.1016/j.ccr.2013.03.022.
- Del Bel Belluz, Lisa, Riccardo Guidi, Ioannis S. Pateras, Laura Levi, Boris Mihaljevic, Syed Fazle Rouf, Marie Wrande, et al. 2016. "The Typhoid Toxin Promotes Host Survival and the Establishment of a Persistent Asymptomatic Infection." *PLoS Pathogens* 12 (4): 1–25. doi:10.1371/journal.ppat.1005528.
- Delia, Domenico, and Shuki Mizutani. 2017. "The DNA Damage Response Pathway in Normal Hematopoiesis and Malignancies." *International Journal of Hematology* 106 (3): 328–34. doi:10.1007/s12185-017-2300-7.
- Donaldson, Michael S. 2004. "Nutrition and Cancer: A Review of the Evidence for an Anti-Cancer Diet." *Nutrition Journal* 3 (1): 19. doi:10.1186/1475-2891-3-19.
- Dunn, Gavin P, Lloyd J Old, and Robert D Schreiber. 2004. "The Three Es of Cancer Immunoediting." *Annual Review of Immunology* 22: 329–60. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
- Erben, Ulrike, Christoph Loddenkemper, Katja Doerfel, Simone Spieckermann, Dirk Haller, Markus M Heimesaat, Martin Zeitz, Britta Siegmund, Anja A. Ku"hl, and Anja A K"uhl. 2014. "A Guide to Histomorphological Evaluation of Intestinal Inflammation in Mouse Models." *Int J Clin Exp Pathol* 7 (8): 4557–76. doi:10.1097/MOT.000000000000150.
- Fantini, M C, and F Pallone. 2008. "Cytokines: From Gut Inflammation to Colorectal Cancer." *Curr.Drug Targets*. 9 (5): 375–80. doi:10.2174/138945008784221206.
- Ferrara, Napoleone, Hans-Peter Gerber, and Jennifer LeCouter. 2003. "The Biology of VEGF and Its Receptors." *Nature Medicine* 9 (6): 669–76. doi:10.1038/nm0603-669.
- Ferrone, Cristina, and Glenn Dranoff. 2010. "Dual Roles for Immunity in Gastrointestinal

- Cancers." *Journal of Clinical Oncology* 28 (26): 4045–51.
doi:10.1200/JCO.2010.27.9992.
- Fidler, Isaiah J. 2003. "The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The 'seed and Soil' Hypothesis Revisited." *Nature Reviews. Cancer* 3 (6): 453–58. doi:10.1038/nrc1098.
- Fischer, A. H., K. A. Jacobson, J. Rose, and R. Zeller. 2008. "Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections." *Cold Spring Harbor Protocols* 2008 (6): pdb.prot4986–pdb.prot4986. doi:10.1101/pdb.prot4986.
- Frolov, Maxim V, and Nicholas J Dyson. 2004. "Molecular Mechanisms of E2F-Dependent Activation and PRB-Mediated Repression." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 11): 2173–81. doi:10.1242/jcs.01227.
- Gabrilovich, Dmitry I., and Srinivas Nagaraj. 2009. "Myeloid-Derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System." *Nature Reviews Immunology* 9 (3): 162–74. doi:10.1038/nri2506.
- Gilbert, Ethel S. 2009. "Ionising Radiation and Cancer Risks: What Have We Learned from Epidemiology?" *International Journal of Radiation Biology* 85 (6): 467–82. doi:10.1080/09553000902883836.
- Gorgoulis, Vassilis G, Leandros-Vassilios F Vassiliou, Panagiotis Karakaidos, Panayotis Zacharatos, Athanassios Kotsinas, Triantafillos Liloglou, Monica Venere, et al. 2005. "Activation of the DNA Damage Checkpoint and Genomic Instability in Human Precancerous Lesions." *Nature* 434 (7035): 907–13. doi:10.1038/nature03485.
- Graillot, Vanessa, Inge Dormoy, Jacques Dupuy, Jerry W. Shay, Laurence Huc, Gladys Mirey, and Julien Vignard. 2016. "Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (March): 1–13. doi:10.3389/fcimb.2016.00034.
- Grivennikov, Sergei I., Florian R. Greten, and Michael Karin. 2010. "Immunity, Inflammation, and Cancer." *Cell* 140 (6). Elsevier Inc.: 883–99. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
- Gueimonde, Miguel, Arthur Ouwehand, Heikki Huhtinen, Eeva Salminen, and Seppo Salminen. 2007. "Qualitative and Quantitative Analyses of the Bifidobacterial Microbiota in the Colonic Mucosa of Patients with Colorectal Cancer, Diverticulitis and

- Inflammatory Bowel Disease." *World Journal of Gastroenterology* 13 (29): 3985–89.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663515>.
- Guidi, Riccardo, Lina Guerra, Laura Levi, Bo Stenerl  w, James G. Fox, Christine Josenhans, Maria G. Masucci, and Teresa Frisan. 2013. "Chronic Exposure to the Cytolethal Distending Toxins of Gram-Negative Bacteria Promotes Genomic Instability and Altered DNA Damage Response." *Cellular Microbiology* 15 (1): 98–113.
doi:10.1111/cmi.12034.
- Gupta, Subash Chandra, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Sadhna Aggarwal, and Bharat B. Aggarwal. 2018. "Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases." *Frontiers in Immunology* 9 (September).
doi:10.3389/fimmu.2018.02160.
- Halazonetis, T. D., V. G. Gorgoulis, and J. Bartek. 2008. "An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development." *Science* 319 (5868): 1352–55.
doi:10.1126/science.1140735.
- Hanahan, D, and R A Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70.
doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harris, Katharine G., and Eugene B. Chang. 2018. "The Intestinal Microbiota in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: New Insights into Complex Disease." *Clinical Science* 132 (18): 2013–28. doi:10.1042/CS20171110.
- Hassanpour, Seyed Hossein, and Mohammadamin Dehghani. 2017. "Review of Cancer from Perspective of Molecular." *Journal of Cancer Research and Practice* 4 (4). Elsevier Taiwan LLC: 127–29. doi:10.1016/j.jcrpr.2017.07.001.
- Hecht, Stephen S. 2003. "Tobacco Carcinogens, Their Biomarkers and Tobacco-Induced Cancer." *Nature Reviews Cancer* 3 (10): 733–44. doi:10.1038/nrc1190.
- Herkenham, Miles, Priyanka Rathore, Pierre Brown, and Samuel J Listwak. 2011. "Cautionary Notes on the Use of NF-KB P65 and P50 Antibodies for CNS Studies." *Journal of Neuroinflammation* 8 (October): 141. doi:10.1186/1742-2094-8-141.
- Hewitt, Maria, Susan L Weiner, and Joseph V Simone. 2003. *Childhood Cancer Survivorship:*

Improving Care and Quality of Life. Childhood Cancer Survivorship: Improving Care and Quality of Life. doi:10.3322/canjclin.54.4.208.

Hickman, Emma S., M. Cristina Moroni, and Kristian Helin. 2002. "The Role of P53 and PRB in Apoptosis and Cancer." *Current Opinion in Genetics and Development* 12 (1): 60–66. doi:10.1016/S0959-437X(01)00265-9.

Hillen, Femke, and Arjan W Griffioen. 2007. "Tumour Vascularization: Sprouting Angiogenesis and Beyond." *Cancer Metastasis Reviews* 26 (3–4): 489–502. doi:10.1007/s10555-007-9094-7.

Irigaray, P., J.A. Newby, R. Clapp, L. Hardell, V. Howard, L. Montagnier, S. Epstein, and D. Belpomme. 2007. "Lifestyle-Related Factors and Environmental Agents Causing Cancer: An Overview." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61 (10): 640–58. doi:10.1016/j.biopha.2007.10.006.

Itzkowitz, S. H. 2004. "Inflammation and Cancer IV. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: The Role of Inflammation." *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (1): G7–17. doi:10.1152/ajpgi.00079.2004.

Kamada, Nobuhiko, Sang-Uk Seo, Grace Y Chen, and Gabriel Núñez. 2013. "Role of the Gut Microbiota in Immunity and Inflammatory Disease." *Nature Reviews. Immunology* 13 (5): 321–35. doi:10.1038/nri3430.

Kerbel, Robert S. 2008. "Tumor Angiogenesis." *The New England Journal of Medicine* 358 (19): 2039–49. doi:10.1056/NEJMr0706596.

Kho, Zhi Y., and Sunil K. Lal. 2018. "The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease." *Frontiers in Microbiology* 9 (August): 1–23. doi:10.3389/fmicb.2018.01835.

Kim, Ryungsa, Manabu Emi, and Kazuaki Tanabe. 2007. "Cancer Immunoediting from Immune Surveillance to Immune Escape." *Immunology* 121 (1): 1–14. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.

Knudson, A G. 1971. "Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (4): 820–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5279523>.

Korenjak, Michael, and Alexander Brehm. 2005. "E2F-Rb Complexes Regulating

- Transcription of Genes Important for Differentiation and Development.” *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (5): 520–27. doi:10.1016/j.gde.2005.07.001.
- Kumar, Vinay, Abul K. Abbas, and Jon C. Aster. 2014. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Igarss 2014*. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Levine, Beth, and Guido Kroemer. 2008. “Autophagy in the Pathogenesis of Disease.” *Cell* 132 (1): 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Luo, Ji, Nicole L. Solimini, and Stephen J. Elledge. 2009. “Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-Oncogene Addiction.” *Cell* 136 (5): 823–37. doi:10.1016/j.cell.2009.02.024.
- MacDonald, Thomas T., Anna Vossenkaemper, Massimo Fantini, and Giovanni Monteleone. 2012. “Reprogramming the Immune System in IBD.” *Digestive Diseases* 30 (4): 392–95. doi:10.1159/000338136.
- Malumbres, Marcos, and Mariano Barbacid. 2003. “RAS Oncogenes: The First 30 Years.” *Nature Reviews. Cancer* 3 (6): 459–65. doi:10.1038/nrc1097.
- Maynard, Craig L, Charles O Elson, Robin D Hatton, and Casey T Weaver. 2012. “Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System.” *Nature* 489 (7415): 231–41. doi:10.1038/nature11551.
- Mughini-Gras, Lapo, Michael Schaapveld, Jolanda Kramers, Sofie Mooij, E Andra Neefjes-Borst, Wilfrid van Pelt, and Jacques Neefjes. 2018. “Increased Colon Cancer Risk after Severe Salmonella Infection.” *PloS One* 13 (1): e0189721. doi:10.1371/journal.pone.0189721.
- Ordás, Ingrid, Lars Eckmann, Mark Talamini, Daniel C Baumgart, and William J Sandborn. 2012. “Ulcerative Colitis.” *The Lancet* 380 (9853): 1606–19. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
- Othman, Mohamed, Roberto Agüero, and Henry C Lin. 2008. “Alterations in Intestinal Microbial Flora and Human Disease.” *Current Opinion in Gastroenterology* 24 (1): 11–16. doi:10.1097/MOG.0b013e3282f2b0d7.
- Pateras, Ioannis S., Sophia Havaki, Xenia Nikitopoulou, Konstantinos Vougas, Paul A. Townsend, Michalis I. Panayiotidis, Alexandros G. Georgakilas, and Vassilis G. Gorgoulis. 2015. “The DNA Damage Response and Immune Signaling Alliance: Is It

- Good or Bad? Nature Decides When and Where." *Pharmacology and Therapeutics* 154. Elsevier Inc.: 36–56. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.06.011.
- Rahner, Nils, and Verena Steinke. 2008. "Hereditary Cancer Syndromes." *Deutsches Arzteblatt International* 105 (41): 706–14. doi:10.3238/arztebl.2008.0706.
- Rakoff-Nahoum, S, and R Medzhitov. 2008. "Role of Toll-like Receptors in Tissue Repair and Tumorigenesis." *Biochemistry. Biokhimiia* 73 (5): 555–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18605980>.
- Reid, Gordon, and Frank A. Carey. 2011. "Pathology of Idiopathic Inflammatory Bowel Disease." *Surgery* 29 (8). Elsevier Ltd: 362–65. doi:10.1016/j.mpsur.2011.05.018.
- Sandouk, Fayez, Feras Al Jerf, and M. H. D. Bassel Al-Halabi. 2013. "Precancerous Lesions in Colorectal Cancer." *Gastroenterology Research and Practice* 2013: 1–11. doi:10.1155/2013/457901.
- Sansonetti, Philippe J, and Ruslan Medzhitov. 2009. "Learning Tolerance While Fighting Ignorance." *Cell* 138 (3): 416–20. doi:10.1016/j.cell.2009.07.024.
- Seitz, Helmut K, Claudio Pelucchi, Vincenzo Bagnardi, and Carlo La Vecchia. 2012. "Epidemiology and Pathophysiology of Alcohol and Breast Cancer: Update 2012." *Alcohol and Alcoholism* 47 (3): 204–12. doi:10.1093/alcalc/ags011.
- Talmadge, James E, and Isaiah J Fidler. 2010. "AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective." *Cancer Research* 70 (14): 5649–69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1040.
- Terzić, Janoš, Sergei Grivennikov, Eliad Karin, and Michael Karin. 2010. "Inflammation and Colon Cancer." *Gastroenterology* 138 (6): 2101–14. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.058.
- The International Agency for Research on Cancer. 2000. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Edited by S.R. Hamilton and L.A. Aaltonen. Lyon: IARC Press.
- Ullman, Thomas A., and Steven H. Itzkowitz. 2011. "Intestinal Inflammation and Cancer." *Gastroenterology* 140 (6). Elsevier Inc.: 1807–16. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.057.
- Uronis, Joshua M, Marcus Mühlbauer, Hans H Herfarth, Tara C Rubinas, Gieira S Jones, and Christian Jobin. 2009. "Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-

Associated Colorectal Cancer Susceptibility." *PloS One* 4 (6): e6026.
doi:10.1371/journal.pone.0006026.

Vander Heiden, Matthew G, Lewis C Cantley, and Craig B Thompson. 2009. "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation." *Science (New York, N.Y.)* 324 (5930): 1029–33. doi:10.1126/science.1160809.

Voigt, Michael D. 2005. "Alcohol in Hepatocellular Cancer." *Clinics in Liver Disease* 9 (1): 151–69. doi:10.1016/j.cld.2004.10.003.

Wicki, A, and J Hagmann. 2011. "Diet and Cancer." *Swiss Medical Weekly* 141: w13250.
doi:10.4414/smw.2011.13250.