

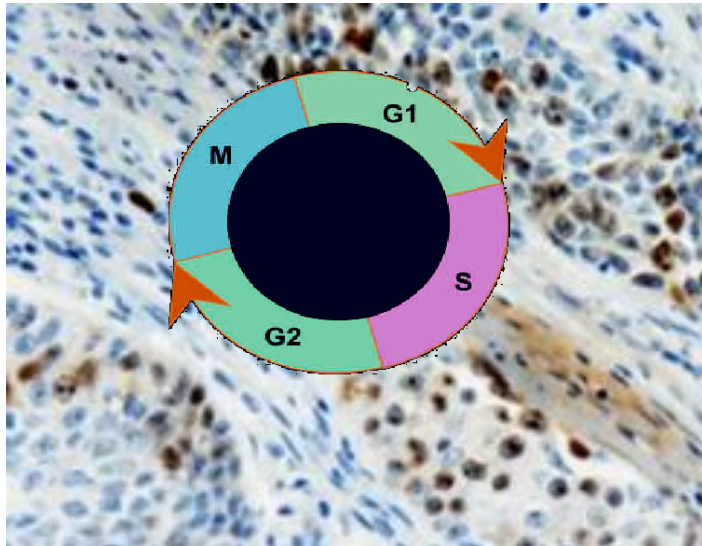
**ΠΜΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ**

Β' Χειρουργική Κλινική ΕΚΠΑ / Αρεταίειο Νοσοκομείο

Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική ΕΚΠΑ / Ιπποκράτειο Γ.Ν.Α

**Καθηγητής Γεώργιος Πολυμενέας**

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ  
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ki 67 ΚΑΙ Topoisomerase IIα ΣΤΟ  
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΠΣ**

**ΥΠΟ ΤΟΥ**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΝΙΩΤΗ**

**ΓΕΝΙΚΟΥ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ 2018**

## ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΡΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ  
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ  
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ  
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΕΘΑΙ  
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ,  
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ  
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΤΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-  
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ  
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΕΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-  
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ  
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ  
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-  
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.  
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ  
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-  
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΠΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ  
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ  
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ  
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΑΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ  
ΠΡΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ  
ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΕΚΟΥΣΙ-  
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΑΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ  
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ  
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΠ' ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ  
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-  
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-  
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ  
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΣΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-  
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ  
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΣΝ

## *Ευχαριστίες*

*Στον Καθηγητή Χειρουργικής κο Πολυμενέα Γεώργιο για τις γνώσεις που μας πρόσφερε κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσής μας στο ΠΜΣ καθώς και στην εμπειρία Χειρουργικής που μας μύησε.*

## *Αφιέρωση*

*Αφιερώνεται στην οικογένεια μου για τη διαρκή υπομονή και στήριξη στην επιστημονική μου διαδρομή.*

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

1. ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ  
Γενικά Στοιχεία  
1α. Στοιχεία Ανατομικής  
1β. Στοιχεία Εμβρυολογίας  
1γ. Στοιχεία Ιστολογίας  
1δ. Στοιχεία Φυσιολογίας
2. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ Π. ΕΝΤΕΡΟΥ
3. ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ
4. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
5. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ
6. ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ ΤΟΡΟΙΣΟΜΕΡΑΣΕ IIa
7. ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ ki 67
8. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ
9. ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ
10. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΕΙΚΟΝΕΣ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

### **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ  
ΠΡΟΤΥΠΟ ΠΙΛΟΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ
2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ  
2 α Προέλευση-Συλλογή-Διαχείριση του βιοπτικού υλικού  
2 β Εργαστηριακός αλγόριθμος μελέτης  
2 γ Κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα βιοπτικού υλικού μελέτης.  
2 δ Ιστοχημική επεξεργασία  
2 ε Πρωτόκολλο ανοσοιστοχημικής διερεύνησης/στ Πρωτόκολλο Ανάλυσης Εικόνας
3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΕΙΚΟΝΕΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ  
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (REFERENCES)

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ

### Γενικά Στοιχεία

#### 1α. Στοιχεία Ανατομικής<sup>1-3</sup>

Ανατομικά και τοπογραφικά το παχύ έντερο αποτελείται από τέσσερα τμήματα: το ανιόν κόλον , το εγκάρσιο κόλον , το κατιόν κόλον , και το σιγμοειδές κόλον (το εγγύτερο κόλον αναφέρεται συνήθως στο ανιόν κόλον και εγκάρσιο κόλον). Το τυφλό έντερο , το κόλον,το ορθο και το κανάλι του πρωκτού συνθέτουν το παχύ έντερο . Η θέση των τμημάτων του παχέος εντέρου είναι είτε στην κοιλιακή κοιλότητα (ενδοπεριτοναϊκή) ή πίσω από αυτήν στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο. Τα οπισθοπεριτοναϊκά όργανα σε γενικές γραμμές δεν έχουν πλήρη κάλυψη του περιτοναίου και είναι καθηλωμένα και ακίνητα. Τα ενδοπεριτοναϊκά όργανα περιβάλλονται εξ ολοκλήρου από περιτόναιο και είναι κινητά. Από το παχύ έντερο, το ανιόν κόλον, το κατιόν κόλον και το ορθό είναι οπισθοπεριτοναϊκά, ενώ το τυφλό έντερο, σκωληκοειδή απόφυση, εγκάρσιο κόλον και το σιγμοειδές κόλον είναι ενδοπεριτοναϊκά. Αυτό είναι σημαντικό καθώς επηρεάζει το ποιά όργανα μπορεί να είναι εύκολα προσβάσιμα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης, όπως στη λαπαροτομία.

Αν και τεχνικά καλύτερα είναι να περιγράψει κανείς το κολον με τα τμήματα του, στην πράξη το κόλον συχνά αναφέρεται με όρους δεξιό και αριστερό κόλον:

Δεξιό κόλον: αποτελείται από το τυφλό έντερο , ανιόν κόλον , ηπατική καμπή , και το εγκάρσιο κόλον .

Αριστερό κόλον: αποτελείται από την σπληνική καμπή , το κατιόν κόλον ,το σιγμοειδές κόλον , την πρωκτό-σιγμοειδή διασταύρωση, και το ορθό .

Το ανιόν κόλον είναι συνδεδεμένο με το λεπτό έντερο, με ένα τμήμα του εντέρου που ονομάζεται τυφλό έντερο. Το ανιόν κόλον διατρέχει την κοιλιακή κοιλότητα, προς τα πάνω μέχρι το εγκάρσιο κόλον για περίπου 20 cm. Μία από τις κύριες λειτουργίες του παχέος εντέρου είναι να απομακρύνει το νερό και άλλα βασικά θρεπτικά στοιχεία από το κόπρανα για την ανακύκλωσή τους πίσω στο σώμα. Καθώς το απόβλητο υλικό εξέρχεται από το λεπτό έντερο θα κινηθεί μέσα στο τυφλό έντερο και στη συνέχεια το ανιόν κόλον όπου η διαδικασία της εκχύλισης ξεκινάει. Το απόβλητο υλικό κινείται προς τα πάνω προς την εγκάρσια τομή του παχέος εντέρου με μια διαδικασία γνωστή ως περισταλτική.

Το εγκάρσιο κόλον είναι το μέρος του παχέος εντέρου από την ηπατική καμπή έως την σπληνική καμπή. Το εγκάρσιο κόλον κρέμεται από το στομάχι , προσδεδεμένο σε αυτό

με μια ευρεία ζώνη ιστού που ονομάζεται το μεγα επίπλουν. Από την οπίσθια πλευρά, το εγκάρσιο κόλον είναι συνδεδεμένο με το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα από ένα μεσεντέριο γνωστό ως εγκάρσιο μεσόκολο. Το εγκάρσιο κόλον είναι εγκιβωτισμένο σε περιτόναιο, και είναι επομένως κινητό (σε αντίθεση με τα τμήματα του κόλον αμέσως πριν και μετά από αυτό). Τα εγγύς δύο τρίτα του εγκάρσιου κόλον διαχέεται από την μέση κολική αρτηρία, ένας κλάδο της SMA, ενώ το τελευταίο τρίτο διαχέεται από κλάδους της IMA. Η περιοχή μεταξύ αυτών των δύο προμηθειών του αίματος, η οποία αντιπροσωπεύει την εμβρυολογική διαίρεση μεταξύ του πρόσθιου εντέρου και του οπίσθιου εντέρου και είναι μια περιοχή ευαίσθητη στην ισχαιμία.

Το κατιόν κόλον είναι το μέρος του παχέος εντέρου από την σπληνική καμπή έως την αρχή του σιγμοειδές κόλον. Η λειτουργία της κατιόντος παχέος εντέρου στο πεπτικό σύστημα είναι η αποθήκευση των κοπράνων που θα αδειάσουν μέσα στον πρωκτό. Είναι οπισθοπεριτοναϊκή στα δύο τρίτα των ανθρώπων. Στο άλλο τρίτο, έχει ένα (συνήθως μικρό) μεσεντέριο. Η αρτηριακή παροχή έρχεται μέσω της αριστερής κολικής αρτηρίας.

Το σιγμοειδές κόλον είναι το μέρος του παχέος εντέρου, μετά το κατιόν κόλον και πριν από το ορθό. Το όνομα *σιγμοειδές* το οφείλει στο σχήμα με το οποίο εμφανίζεται. Τα τοίχωμα του σιγμοειδούς είναι μυϊκό, και όταν η πίεση αυξηθεί στο εσωτερικό του παχέος εντέρου, προκαλείται κίνηση μέσα στον πρωκτό. Το σιγμοειδές τροφοδοτείται με αίμα από διάφορους κλάδους (συνήθως μεταξύ 2 και 6) των σιγμοειδών αρτηριών, που είναι υποκλάδοι της IMA. Το IMA καταλήγει στην άνω πρωκτική αρτηρία.

### **1β. Στοιχεία Εμβρυολογίας<sup>4</sup>**

Το παχύ έντερο αναπτύσσεται από το αρχέγονο έντερο, το οποίο δημιουργήθηκε από την αναδίπλωση του εμβρυικού δίσκου κατά τη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας. Ο σχηματισμός του αρχέγονου εντέρου αποδίδει ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του σπονδυλωτού σχεδίου του σώματος (ένας σωλήνας μέσα σε έναν άλλο σωλήνα). Αργότερα η ανάπτυξη του εντέρου, περιλαμβάνει την περιστροφή του εντέρου, την ανάπτυξη των αδένων και των οργάνων. Ο βλεννογόνος και οι συναφείς αδένες της γαστρεντερικής οδού αναπτύσσονται από το ενδόδερμα. Το εμβρυικό ενδόδερμα σχηματίζεται στην τρίτη εβδομάδα, από το κοιλιακό στρώμα του εμβρυικού δίσκου. Ο συνδετικός ιστός, οι μύες και το μεσοθήλιο προέρχονται από το σπλαχνικό μεσόδερμα. Η πλευρική περιοχή της πλάκας του μεσοδέρματος μπορεί να διακριθεί την τέταρτη εβδομάδα. Στο οπίσθιο (ουραίο) μισό του εμβρύου, η πλευρική πλάκα του μεσοδέρματος διαχωρίζεται για να σχηματίσει ένα ραχιαίο

μεσόδερμα σωματικό και ένα κοιλιακό σπλαχνικό μεσόδερμα. Το σωματικό μεσόδερμα με το υπερκείμενο εξώδερμα ονομάζεται σωματόπλευρα και το σπλαχνικό μεσόδερμα με το ενδόδερμα ονομάζεται σπλαχνόπλευρα. Το εντερικό νευρικό σύστημα αναπτύσσεται από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Με την αναδίπλωση του εμβρυικού δίσκου την τέταρτη εβδομάδα δημιουργείται το αρχέγονο έντερο. Η πλευρική αναδίπλωση της σπλαχνόπλευρας σε μια μεσαία γραμμή κατά μήκος του σωλήνα στο πρόσθιο-οπίσθιο άξονα και η πλευρική αναδίπλωση της σωματόπλευρας κλείνει το τοίχωμα του σώματος δημιουργώντας το περιτόναιο. Ταυτόχρονα, η σύνδεση μεταξύ του αρχέγονου εντέρου και του ραχιαίου τοιχώματος λεπταίνει για να σχηματίσει ένα ραχιαίο μεσεντέριο. Η κρανιακή αναδίπλωση του εμβρύου φέρνει το πρόσθιο άκρο του εμβρυικού δίσκου προς τα κάτω, στο επίπεδο του απώτατου άκρου του πρόσθιου εντέρου, όπου σχηματίζει το εγκάρσιο διάφραγμα, και της προχορδιακής πλάκας προς το κρανιακό άκρο του αρχέγονου εντέρου, όπου σχηματίζει την στοματοφαρυγγική (στοματοφάρυγγα) μεμβράνη. Το εγκάρσιο διάφραγμα γίνεται ο κεντρικός τένοντας του διαφράγματος και του κοιλιακού μεσογάστριου. Το κοιλιακό μεσγάστριο δημιουργεί τον σύνδεσμο falciform, την κάψουλα του ήπατος και το έλασσον επίπλουν. Η ουραία αναδίπλωση του εμβρύου τοποθετεί μια μεμβράνη στο τερματικό άκρο του αρχέγονου εντέρου. Το αρχέγονο έντερο χωρίζεται σε τρεις περιοχές: το πρόσθιο, το μέσο και το οπίσθιο έντρο. Αρχικά το μέσο έντερο καθορίζεται από το τμήμα που βρίσκεται μέσα στο λεκιθικό ασκό. Αργότερα, οι διαχωριστικές γραμμές μεταξύ των περιοχών ορίζεται από τα σύνορα των αγγειακών περιοχών της κοιλιοκάκης και αφορά στην άνω και κάτω μεσεντέρια αρτηρία. Αυτές οι αρτηρίες βρίσκονται στο ραχιαίο μεσογάστριο, το μεσεντέριο του μέσου και το μεσεντέριο του οπίσθιου εντέρου, αντίστοιχα.

### **1γ. Στοιχεία Ιστολογίας<sup>5,6</sup>**

Το παχύ έντερο ακολουθεί την ιστολογική εικόνα η οποία αντανακλά στην εξειδικευμένη λειτουργία του και είναι μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα. Η γαστρεντερική οδός μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερα ομόκεντρα στρώματα με την ακόλουθη σειρά:

α. Βλεννογόνος, β. Υποβλεννογόνιος, γ. Μυϊκός χιτώνας(το εξωτερικό μυϊκό στρώμα), δ. Ορογόνος

Ο βλεννογόνος είναι η εσώτατη στιβάδα της γαστρεντερικής οδού. δηλαδή περιβάλλει τον αυλό , ή ανοικτό χώρο μέσα στο σωλήνα. Αυτό το στρώμα έρχεται σε άμεση επαφή με την πέψη των τροφίμων. Ο βλεννογόνος αποτελείται από τρία στρώματα: Επιθηλίου - εσώτατο στρώμα. Υπεύθυνο για τις περισσότερες λειτουργίες του πεπτικού συστήματος,



απορροφητικές και εκκρίσεως, . Χωρίου - ένα στρώμα συνδετικού ιστού. Ασυνήθιστα κυτταρική σύγκριση με τις περισσότερες συνδετικού ιστού.. Μυϊκού βλεννογόνου - ένα λεπτό στρώμα λείου μυός. Ο βλεννογόνος έχει υψηλή εξειδίκευση σε κάθε όργανο του γαστρεντερικού σωλήνα για την αντιμετώπιση των διαφορετικών συνθηκών. Το μικρό επιθήλιο του εντέρου (ιδιαίτερα ο ειλεός ) είναι εξειδικευμένο για την απορρόφηση και είναι οργανωμένο σε λάχνες. Αυτό δημιουργεί ένα περίγραμμα βούρτσας, η οποία αυξάνει σημαντικά την επιφάνεια για απορρόφηση. Το επιθήλιο είναι απλή μορφή στήλης με microvilli. Στον ειλεό υπάρχουν περιστασιακά Παυέριες πλάκες. Το προσάρτημα έχει βλεννογόνο του παχέος εντέρου μοιάζει, αλλά έχει μεγάλη συγκέντρωση λεμφοκυττάρων. Η ορθο-πρωκτική διασταύρωση είναι και πάλι πολύ απότομη. Υπάρχει μια μετάβαση από την απλή μορφή στήλης σε πολύστοιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο επιθήλιο (όπως στον οισοφάγο) για προστατευτικούς σκοπούς.

Ο υποβλεννογόνος αποτελείται από ένα πυκνό ακανόνιστο στρώμα συνδετικού ιστού με μεγάλα αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία, και νεύρα διακλάδισμένα εντός του βλεννογόνου και μυϊκού χιτώνα. Περιέχει το πλέγμα του Meissner, ένα εντερικό νευρικό πλέγμα , το οποίο βρίσκεται πάνω στην εσωτερική επιφάνεια της εξωτερικής μυϊκής στοιβάδας .

Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από έναν εσωτερικό κυκλικό στρώμα και ένα διάμηκες εξωτερικό μυϊκό στρώμα. Το κυκλικό στρώμα εμποδίζει το φαγητό να ταξιδεύει προς τα πίσω και το διαμήκη στρώμα μειώνει την οδό. Τα στρώματα δεν είναι αληθινά διαμήκη ή κυκλικά, μάλλον τα στρώματα του μυός είναι ελικοειδείς με διαφορετικές κλίσεις. Οι συντονισμένες συστολές των στρωμάτων αυτών ονομάζεται περίσταλη και προωθεί το φαγητό μέσω του σωλήνα. Ο βλωμός (μπάλα των τροφίμων) περνάει από το στόμα προς τα κάτω στο στομάχο. Μετά το στομάχι, το τρόφιμο χωνεύεται μερικώς και παίρνει ημι-υγρή μορφή, που αναφέρεται ως χυμός . Στο παχύ έντερο το εναπομένον υλικό βρίσκεται σε ημι-στερεή μορφή που αναφέρεται ως κόπρανα. Μεταξύ των δύο στρωμάτων των μυών είναι υπάρχει το μυεντερικό πλέγμα του Auerbach, το οποίο ελέγχει την περίσταλη. Αυτή η δραστηριότητα ξεκινά από τα κύτταρα του βηματοδότη ( διάμεσα κύτταρα του Cajal ). Το έντερο έχει εγγενή περισταλτική δραστηριότητα ( βασικό ηλεκτρικό ρυθμό ) λόγω του αυτόνομου του εντερικού νευρικού συστήματος. Ο ρυθμός μπορεί φυσικά να διαμορφώνεται από το υπόλοιπο αυτόνομο νευρικό σύστημα. Το πάχος της εξωτερικής μυϊκής διαφέρει σε κάθε τμήμα της οδού. Στο κόλον, για παράδειγμα, το μυϊκό στρώμα είναι πολύ παχύτερο επειδή τα κόπρανα είναι μεγάλα και βαριά και απαιτούν μεγαλύτερη δύναμη

για να ωθήσει κατά μήκος. Το εξωτερικό διάμηκες στρώμα του κόλου διακρίνεται σε 3 ασυνεχείς διαμήκεις λωρίδες, γνωστές ως κολικές ταινίες. Αυτό είναι ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα, που βοηθά στη διάκριση μεταξύ του παχέος και του λεπτού εντέρου.

Το εξωτερικό στρώμα του γαστρεντερικού σωλήνα αποτελείται από αρκετά στρώματα συνδετικού ιστού. Τα ενδοπεριτοναϊκά τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα καλύπτονται με ορογόνο. Αυτά περιλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του στομάχου, το πρώτο μέρος του δωδεκαδακτύλου, το σύνολο του λεπτού εντέρου, το τυφλό και το προσάρτημα, το εγκάρσιο κόλον, το σιγμοειδές κόλον και το ορθό. Σε αυτά τα τμήματα του εντέρου, υπάρχει σαφές όριο μεταξύ του εντέρου και τον περιβάλλοντα ιστό. Αυτά τα τμήματα του σωλήνα έχουν ένα μεσεντέριο. Τα οπισθοπεριτοναϊκά τμήματα καλύπτονται με χιτώνα. Μπορούν και δένουν στον περιβάλλοντα ιστό και είναι στερεωμένα στη θέση τους. Οπισθοπεριτοναϊκά βρίσκεται ο οισοφάγος, ο πυλωρός του στομάχου, το απώτατο δωδεκαδάκτυλο, το ανιόν κόλον, το κατιόν κόλο και το πρωκτικό κανάλι.

### **1δ. Στοιχεία Φυσιολογίας<sup>7</sup>**

Το παχύ έντερο είναι επιφορτισμένο ως φυσιολογική συνέχεια του γαστρεντερικού σωλήνα με την αποθήκευση των αποβλήτων, την ανάκτηση του νερού, την απορρόφηση βιταμινών, όπως η βιταμίνη Κ, μέσω της φυσιολογικής ομοιοστασίας της χλωρίδας που φιλοξενεί. Στις περισσότερες τροφές έχει απορροφηθεί το 90% του νερού, στο λεπτό έντερο. Στο παχύ έντερο μερικοί ηλεκτρολύτες όπως το νάτριο, το μαγνήσιο, και το χλώριο αφήνονται καθώς χωνεύεται τμήματα της προσλαμβανόμενης τροφής (π.χ., ένα μεγάλο μέρος των προσλαμβανόμενων αμυλούχων, το άμυλο που έχουν προστατεύεται από την πέψη μέχρι τούδε, και οι διαιτητικές ίνες, η οποίες είναι σε μεγάλο βαθμό δύσπεπτοι υδατάνθρακες είτε σε διαλυτή ή αδιάλυτη μορφή). Καθώς ο χυμός μετακινείται διαμέσου του παχέως εντέρου, το υπόλοιπο νερό απομακρύνεται, ενώ η χυμός αναμιγνύεται με βλέννα και βακτήρια (γνωστή ως εντερική χλωρίδα), και δημιουργούνται τα συμπαγή περιττώματα. Το ανιόν κόλον δέχεται τα περιττώματα σαν ένα υγρό. Οι μύες του εντέρου στη συνέχεια μετακινούν το υδαρή απόβλητα προς τα εμπρός και σιγά-σιγά απορροφάται η περίσσεια του νερού. Τα κόπρανα σταδιακά στερεοποιούνται καθώς κινούνται κατά μήκος μέσα στο κατιόν κόλον. Τα βακτήρια σπάνε τις ίνες της τροφής για να τραφούν και παράγουν οξικό, προπιονικό και βουτηρικό σαν δικά τους απόβλητα, τα οποία χρησιμοποιούνται από το κυτταρικό τοίχωμα ως τροφή. Αυτό είναι ένα παράδειγμα μιας συμβιωτικής σχέσης και

παρέχει περίπου εκατό θερμίδες την ημέρα στο σώμα. Το παχύ έντερο δεν παράγει πεπτικά ένζυμα. Η χημική πέψη ολοκληρώνεται στο λεπτό έντερο πριν ο χυμός φθάσει στο παχύ έντερο. Το pH στο κόλον κυμαίνεται μεταξύ 5,5 και 7 (ελαφρώς όξινο έως ουδέτερο).

## **2. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ<sup>8,9</sup>**

### Καλοήθεις νεοπλασίες (πολύποδες)

- α. υπερπλαστικοί πολύποδες
- β. νεοπλασματική πολυποδίαση
- γ. αμαρτώματα,
- δ. φλεγμονώδεις πολύποδες.

### Κακοήθεις νεοπλασίες

Αδενοκαρκίνωμα

Στρωματικοί όγκοι (GIST)

Μελάνωμα

Λέμφωμα

Σπάνιοι όγκοι (εξορμώμενοι από αρχέγονους ιστούς)

Μεταστατικοί όγκοι

## **3. ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ<sup>10-14</sup>**

Σε παγκόσμιο επίπεδο περισσότερο από 1 εκατομμύριο άνθρωποι πάσχουν από καρκίνο του παχέος εντέρου ετησίως. Από το 2008, είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία καρκίνου στις γυναίκες και η τρίτη πιο συχνή στους άνδρες. Είναι πιο συχνή στις ανεπτυγμένες χώρες. Τα συμπτώματα και τα σημεία του ορθοκολικού καρκίνου εξαρτώνται από την θέση του όγκου στο έντερο, και από το αν έχει εξαπλωθεί αλλού στο σώμα (μετάσταση). Τα κλασικά προειδοποιητικά σημεία περιλαμβάνουν:

επιδεινούμενη δυσκοιλιότητα , αίμα στα κόπρανα, απώλεια βάρους, πυρετό, απώλεια της όρεξης, και ναυτία ή εμετό, σε κάποιον άνω των 50 ετών Η αιμορραγία από το ορθό ή η αναιμία είναι υψηλού κινδύνου χαρακτηριστικά σε άτομα άνω της ηλικίας των 50 ετών. Περισσότερο από το 75-95% του καρκίνου του παχέος εντέρου εμφανίζεται σε άτομα με ελάχιστο ή κανένα γενετικό κίνδυνο (9). Οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν την ηλικία, το άρρεν φύλο,<sup>[7]</sup> την υψηλή πρόσληψη λίπους, το αλκοόλ ή τη κατανάλωση κόκκινου κρέατος , την παχυσαρκία ,το κάπνισμα και την έλλειψη σωματικής άσκησης . (9) Περίπου το 10% των περιπτώσεων συνδέονται με την ανεπαρκή δραστηριότητα. Άτομα με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου ( ελκώδης κολίτιδα και νόσος του Crohn ), βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου. Το αδενοκαρκίνωμα ιστοπαθολογικά είναι ένας κακοήθης επιθηλιακός όγκος, που προέρχεται από το αδενικό επιθήλιο του βλεννογόνου του παχέος εντέρου. Εισβάλλει στο τοίχωμα, διεισδύοντας στο μυϊκό βλεννογόνο , στο υποβλεννογόνιο και από εκεί στο μυϊκό χιτώνα. Τα καρκινικά κύτταρα περιγράφονται με αντικανονικές σωληναριακές δομές. Μερικές φορές, τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν βλέννα, η οποία εισβάλλει στο διάμεσο χώρο και δημιουργούν στρώματα βλέννας / κολλοειδούς (οπτικά "κενό" χώρο) και αφορά σε *βλεννώδεις (κολλοειδείς)* αδενοκαρκίνωμα, χαμηλής διαφοροποίησης. Εάν η βλέννα παραμένει στο εσωτερικό του κυττάρου, αυτή ωθεί τον πυρήνα στην περιφέρεια και η εικόνα αυτή χαρακτηρίζεται ως "σφραγιστικός δακτύλιος-κυττάρων." Ανάλογα με την αδενική αρχιτεκτονική, κυτταρικό πλειομορφισμό, και έκκριση βλέννας, το αδενοκαρκίνωμα μπορεί να διακριθεί σε τρεις βαθμούς διαφοροποίησης: καλής, μέτριας, και χαμηλής διαφοροποίησης. Οι περισσότεροι όγκοι του καρκίνου παχέος πιστεύεται ότι είναι θετικοί στην κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2). Το ένζυμο αυτό δεν βρίσκεται σε υγιή ιστό του παχέος εντέρου και πιστεύεται ότι τροφοδοτεί την ανώμαλη κυτταρική ανάπτυξη.

#### **4. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ<sup>15,16</sup>**

Η σταδιοποίηση είναι μια εκτίμηση του μεγέθους της διείσδυσης και των μεταστάσεων ενός συγκεκριμένου καρκίνου. Γίνεται για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς, και για να καθορίσει την καλύτερη μέθοδο θεραπείας. Τα συστήματα για την σταδιοποίηση των καρκίνων εντέρου εξαρτώνται από το βαθμό του τοπικής διείσδυσης, ο βαθμός συμμετοχής λεμφαδένων και αν υπάρχει μακρινή μετάσταση . Οριστική στάδιοποίηση μπορεί να γίνει μόνο μετά από χειρουργική επέμβαση. Μια εξαίρεση σε αυτή την αρχή θα ήταν με την βοήθεια μιας ενδοσκοπικής πολυποδεκτομής ενός κακοήθους

πολύποδα με ελάχιστη διείσδυση. Προεγχειρητική σταδιοποίηση του καρκίνου του ορθού μπορεί να γίνει με ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα. Η διερεύνηση και η εκτίμηση των μεταστάσεων περιλαμβάνουν Κοιλιακό υπερηχογράφημα, MRI, CT, PET σάρωσης, και άλλες απεικονιστικές εξετάσεις. Το πιο κοινό σύστημα σταδιοποίησης είναι το TNM (για όγκους / λεμφαδένες / μεταστάσεις) συστημα, από την Αμερικανική Μεικτή Επιτροπή για τον Καρκίνο (AJCC). Το σύστημα TNM δίδει έναν κωδικό που βασίζεται σε τρεις κατηγορίες. Το "T" δηλώνει το βαθμό της εισβολής του εντερικού τοιχώματος, το "N" του βαθμού της λεμφαδενικής συμμετοχής, και το "M" το βαθμό της μετάστασης. Το ευρύτερο στάδιο ενός καρκίνου συνήθως αναφέρεται ως ένας αριθμός I, II, III, IV που προέρχεται από την τιμή TNM ομαδοποιημένο κατά πρόγνωση.

AJCC στάδιο	TNM στάδιο	2002 6η έκδοση κριτήρια στάδιο TNM για καρκίνο του παχέος εντέρου (που αντικαταστάθηκε το 2010 7η έκδοση)(26)
Στάδιο 0	Tis N0 M0	Tis: όγκος που περιορίζεται στο βλεννογόνο (καρκίνο <i>in – situ</i> )
Στάδιο I	T1 N0 M0	T1: όγκος που εισβάλλει στον υποβλεννογόνιο χιτώνα
Στάδιο I	T2 N0 M0	T2: όγκος που εισβάλλει στο μυϊκό χιτώνα
Στάδιο II-A	T3 N0 M0	T3: όγκος που εισβάλλει subserosa και πέρα (χωρίς συμμετοχή άλλων οργάνων)
Στάδιο II-B	T4 N0 M0	T4: όγκος που εισβάλλει στα γειτονικά όργανα ή διατρύπα το σπλαχνικό περιτόναιο
Φάση III-A	T1-2 N1 M0	N1: Μετάσταση σε 1 έως 3 περιφερειακούς λεμφαδένες. T1 ή T2.
Φάση III-B	T3-4 N1 M0	N1: Μετάσταση σε 1 έως 3 τοπικούς λεμφαδένες. T3 ή T4.
Φάση III-Γ	κάθε T, N2 M0	N2: Μετάσταση σε 4 ή περισσότερους τοπικούς λεμφαδένες. Κάθε T.

Στάδιο IV	κάθε T, κάθε N, M1	M1: απομακρυσμένες μεταστάσεις. Κάθε T, κάθε N.
--------------	-----------------------	---

### Dukes σύστημα

Η ταξινόμηση Dukes είναι ένα παλαιότερο και λιγότερο περίπλοκο σύστημα σταδιοποίησης, που προηγείται το σύστημα TNM. Προσδιόρισε τα στάδια, όπως (27):

- A – όγκος που περιορίζεται στο εντερικό τοίχωμα
- B – Όγκος που εισβάλλει διαμέσω του εντερικού τοιχώματος
- C - Με λεμφαδένων (α) συμμετοχή (αυτό υποδιαιρείται σε C1 με συμμετοχή λεμφαδένων όπου ο ακραίος λεμφαδένας δεν εμπλέκεται και C2, όπου ο ακραίος λεμφαδένας εμπλέκεται)
- D - Με μακρινή μετάσταση

### Astler-Coller

A: όγκος που περιορίζεται στο βλεννογόνο (Καρκίνωμα in situ)

B1: όγκος μεγαλώνει μέσα από τον μυϊκό βλεννογόνο, αλλά όχι μέσω muscularis propria

B2: όγκος που αυξάνεται πέρα από τον μυϊκό χιτώνα

C1: B1 Στάδιο με μεταστάσεις στους περιφερειακούς λεμφαδένες

C2: B2 Στάδιο με μεταστάσεις στους περιφερειακούς λεμφαδένες

D: Μακρινές μεταστάσεις.

Πρόσθετη σταδιοποίηση

φλεβική προσβολή (v)

- v0 χωρίς φλεβική προσβολή
- v1 μικροσκοπική φλεβική προσβολή

- v2 μακροσκοπική φλεβική προσβολή

λεμφική προσβολή(ιβ)

- 10 χωρίς λεμφική προσβολή
- 11 με λεμφική προσβολή

ιστολογικός βαθμός (G)

- g1 καλά διαφοροποιημένο
- g2 μετρίως διαφοροποιημένο
- g3 χαμηλή διαφοροποίηση
- g4 αδιαφοροποίητο

## 5. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ<sup>17-20</sup>

Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου εξωρμάται από τα επιθηλιακά του κόλου ή του ορθού, πιο συχνά ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων στο μονοπάτι Wnt . Οι μεταλλάξεις μπορούν να κληρονομούνται ή να αποκτώνται , και πιθανότατα συμβαίνουν στην εντερική κρύπτη των βλαστικών κυττάρων . (12) Το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο σε όλους τους καρκίνους του παχέος εντέρου είναι το APC γονίδιο, το οποίο παράγει την APC πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη APC είναι ένα "φρένο" επί της συσσώρευσης β-κατενίνης πρωτεΐνης. Χωρίς την APC, η β-κατενίνη συσσωρεύεται σε υψηλά επίπεδα και μετατοπίζεται (μετακινείται) μέσα στον πυρήνα, συνδέεται με το DNA, και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων που είναι κανονικά σημαντική για την ανανέωση των βλαστικών κυττάρων και την διαφοροποίηση, αλλά όταν ανάρμοστα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Ενώ η APC είναι μεταλλαγμένη στους περισσότερους καρκίνους του παχέος εντέρου, ορισμένοι καρκίνοι έχουν αυξημένη β-κατενίνη, λόγω μεταλλάξεων στη β-κατενίνης(CTNNB1) που μπλοκάρουν την αποικοδόμησή της, ή εμφανίζονται μετάλλαξη (-εις) σε άλλα γονίδια με λειτουργία ανάλογη της APC όπως τα AXIN1 ,AXIN2 , TCF7L2 , ή NKD1 . Πέρα από τις ατέλειες στο Wnt-APC-βήτα-κατενίνης μονοπάτι σηματοδότησης, άλλες μεταλλάξεις πρέπει να συμβούν για να εξελιχθεί το κύτταρο σε καρκινικό. Η p53 πρωτεΐνη, που παράγεται από το TP53 γονίδιο, παρακολουθεί κανονικά την κυτταρική διαίρεση και σκοτώνει τα κύτταρα εάν έχουν ελαττώματα Wnt μονοπατιού. Τελικά, μία κυτταρική σειρά αποκτά μια μετάλλαξη

στο *TP53* γονίδιο και μετασχηματίζει τον ιστό από ένα αδένωμα σε ένα διηθητικό καρκίνωμα.) Άλλες αποπτωτικές πρωτεΐνες συνήθως απενεργοποιούνται από τα TGF-β και DCC (Deleted Colon Cancer). Η TOP-β έχει μια μετάλλαξη αποενεργοποίησης σε τουλάχιστον το ήμισυ των ορθοκολικών καρκίνων. Μερικές φορές TOP-β δεν απενεργοποιείται, αλλά μια πρωτεΐνη που ονομάζεται SMAD. Μερικά γονίδια είναι ογκογονίδια και υπερεκφράζονται στον ορθοκολικό καρκίνο. Για παράδειγμα, γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνες του KRAS, RAF, και PI3K, οι οποίες διεγείρουν κανονικά το κύτταρο να διαιρούνται σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, μπορούν να αποκτήσουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερ-ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η χρονολογική σειρά των μεταλλάξεων είναι μερικές φορές σημαντική. Μία πρωτοταγή μετάλλαξη KRAS, γενικά οδηγεί σε μια αυτοπεριοριζόμενη υπερπλαστική ή οριακή βλάβη, αλλά αν συμβαίνει μετά από μια προηγούμενη μετάλλαξη APC συχνά εξελίσσεται σε καρκίνο. Το PTEN, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, κανονικά αναστέλλει την PI3K, αλλά μπορεί μερικές φορές να μεταλλαχθεί και να απενεργοποιηθεί. Τα ορθοκολικά καρκινώματα μπορούν να διαχωριστούν σαφώς σε υπερμεταλαγμένα και μη. (14) Μη-υπερμεταλαγμένα δείγματα περιέχουν μεταλλαγμένα CTNNB1, FAM123B, SOX9, ATM, και ARID1A. Αντίστοιχα οι υπερμεταλαγμένοι όγκοι αφορούν σειρά μεταλλάξεων στα ACVR2A, TGFBR2, MSH3, MSH6, SLC9A9, TCF7L2, και BRAF. Το κοινό θέμα μεταξύ αυτών των γονιδίων, και στους δύο τύπους όγκων, είναι η συμμετοχή τους στα WNT και TOP-β μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία με τη σειρά του οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα του MYC, έναν κεντρικό παίκτη στον ορθοκολικό καρκίνο.

## **6. TO ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ IIa<sup>21-24</sup>**

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Τοποισομεράση IIa (Toro IIa) εδράζεται επίσης στο χρωμόσωμα 17 (gene locus: 17q21.2) και συχγρονίζεται δομικά επί ενός τμήματος του χρωμοσώματος με ένα άλλο σημαντικό γονίδιο, το HER2/neu (17q12). Λειτουργικά η πρωτεΐνη δρα ως ένζυμο ρύθμισης και ομοιοστασίας της δομής του DNA. Συγκεκριμένα ρυθμίζει τη στερεοδιάταξη, την τοπολογία του μορίου στο χώρο αποκόπτοντας τα υπερελικωμένα τμήματά του, ευοδώνοντας την ομαλή μετάβαση της μίας μέσα από την αντίστοιχη, συμβάλλοντας επίσης θετικά στη ρύθμιση της μεταγραφής του μορίου ενώ σε επίπεδο χρωμοσώματος ωθεί τη συμπίκνωσή του και τον ομαλό αποχωρισμό των χρωματίδων. Η τοποισομεράση IIa μοιράζεται το σημαντικό ρυθμιστικό της ρόλο με την τοποισομεράση I που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3. Πολλές σημαντικές μελέτες αναφέρονται



στη συσχέτιση της έκφρασής της με την πρόγνωση ασθενών πασχόντων από καρκινώματα διάφορης ιστικής προέλευσης και μέσω των μηχανισμών ενίσχυσης ή διαγραφής σπανιότερα του γονιδίου. Όσον αφορά την επίδραση της έκφρασης του μορίου στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντερου υπάρχουν περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα οποία όμως καταδεικνύουν μια υπερέκφραση που πιθανόν με βάση το μοριακό υπόστρωμα δύναται να χρησιμοποιηθεί για εφαρμογή στοχευμένης χημειοθεραπείας ειδικά ανθρακυκλινών, όπως συμβαίνει ογκολογικά στον καρκίνο του μαστού. Δρά στην ύστερη φάση S, τη G2 και την M και η ανίχνευσή της θεωρείται πιο ευαίσθητος δείκτης πυρηνικού πολλαπλασιασμού από την πρωτεΐνη Ki-67, της οποίας η δράση της- πλύν της G0 ξεκινά στο μέσον της φάσης G1 και σταδιακά αυξάνει κατά τη διάρκεια της S και της G2 κορυφούμενη κατά τη διάρκεια της M (μίτωσης) με ταχύ καταβολισμό στο τέλος της

## **7. ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ ki 67<sup>25-27</sup>**

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ki 67 εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 (cytogenetic band: 10q26.2) Το αντιγόνο Ki-67 είναι μια πρωτεΐνη του πυρήνα και συγκεκριμένα του πυρηνίου, η οποία προσδιορίζεται από τη δραστηριότητά της με μονοκλωνικό αντίσωμα από τον κλώνο Ki-67 (4). Έχουν ταυτοποιηθεί δύο ισομορφές των 345 και 395 kDa (5). Το αντιγόνο Ki-67 εκφράζεται κατά προτίμηση κατά τη διάρκεια όλων των ενεργών φάσεων του κυτταρικού κύκλου ( φάσεις G 1 , S, G M), αλλά απουσιάζει από τα κύτταρα σε φάση ηρεμίας ( φάση G0 ) (4). Στη διάρκεια της μεσόφασης , το αντιγόνο ανιχνεύεται αποκλειστικά εντός του πυρήνα , ενώ κατά τη μίτωση, το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης μετατοπίζεται στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Το αντιγόνο αποσυντίθεται γρήγορα καθώς το κύτταρο εισέρχεται σε κατάσταση πολλαπλασιασμού και φαίνεται ότι δεν υπάρχει έκφραση του Ki-67 κατά τη διάρκεια των διεργασιών επιδιόρθωσης του DNA. Όσον αφορά την επίδραση της έκφρασης του μορίου στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντερου, η υπερέκφραση σχετίζεται με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά του όγκου.

## **8. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ<sup>28-30</sup>**

Η στοχευμένη θεραπεία αποτελεί την πιο σύγχρονη έκφανση της θεραπευτικής προσέγγισης στην ογκολογική διαχείριση ασθενών πασχόντων από κακοήθεις νεοπλασίες. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα αντίστοιχα σκευάσματα γενικά αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων παρεμβαίνοντας σε συγκεκριμένα μόρια, που εμπλέκονται στην καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου, και όχι απλώς παρεμβαίνοντας στα ταχέως

διαιρούμενα κύτταρα (π.χ. με την παραδοσιακή χημειοθεραπεία). Οι στοχευμένες θεραπείες του καρκίνου αναμένεται να είναι πιο αποτελεσματικές, από ό, τι οι τρέχουσες θεραπείες και λιγότερο επιβλαβείς για τα φυσιολογικά κύτταρα. Υπάρχουν στοχευμένες θεραπείες για τον καρκίνο του μαστού, το πολλαπλό μυέλωμα, το λέμφωμα, τον καρκίνο του προστάτη, το μελάνωμα, το παχύ έντερο, καθώς και τους όγκους κεφαλής – τραχήλου συμπεριλαμβανομένου του πλακώδους καρκινώματος του λάρυγγα. Οι κύριες κατηγορίες της στοχευμένης θεραπείας είναι τα μικρά μόρια και τα μονοκλωνικά αντισώματα.

## 9. ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ<sup>31</sup>

Η ανάγκη για εξεύρεση νέων μεθόδων με σκοπό την προαγωγή της διαγνωστικής διαδικασίας στην Παθολογική Ανατομική και Κυτταρολογία οδήγησε στην ανακάλυψη της ανοσοιστοχημείας. Αυτή αποτελεί τομέα της ιστοπαθολογίας και ασχολείται με την αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων και ιστών. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά με αποτέλεσμα την έκκριση μεταλλαγμένων βιολογικών προϊόντων ειδικού ή όχι τύπου για το συγκεκριμένο είδος κυττάρων εξόρμησης του όγκου (βιολογικοί ή βιοχημικοί ή καρκινικοί δείκτες-Tumor markers). Η αναγνώριση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον των αντιγόνων-στόχων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ειδικές χρωστικές, καθιστώντας κατ' αυτό τον τρόπο ορατές τις θέσεις εντοπισμού των αντιγόνων αυτών. Αν και ο ανοσοφθορισμός – πρόδρομη τεχνική ανίχνευσης πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας σύνδεσης αντισωμάτων με φθορίζουσα χρωστική, την ισοθιοκυανική φλουροσκεΐνη– υπήρξε για μεγάλο χρονικό διάστημα η μοναδική μέθοδος αναγνώρισης στους ιστούς ειδικών αντιγόνων, ανοσοσφαιρινών και διαφόρων κλασμάτων του συμπληρώματος, αναπτύχθηκαν πιο αξιόπιστες και εξειδικευμένες τεχνικές για άμεση και ορατή με συμβατική μικροσκόπηση εκτίμηση του αποτελέσματος.

Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στη χρησιμοποίηση ενζύμων ή ενζυματικών συστημάτων που εφαρμόζονται στους ιστούς ή σε κυτταρικά επιχρίσματα μετά τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος, χρωματίζοντας έντονα τις θέσεις εντόπισής τους καθιστώντας τις έτσι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο. Οι τεχνικές αυτές ονομάζονται ανοσοενζυμικές και οι πιο σημαντικές είναι οι μέθοδοι ανοσοπεροξειδάσης, αβιδίνης-βιοτίνης, στεπταβιδίνης καθώς και νέες μέθοδοι παράκαμψης της βιοτίνης με τη χρήση πολυμερούς δεξτράνης. Κομβικό ρόλο στην αύξηση της ευαισθησίας και ειδικότητας των προαναφερθέντων μεθόδων

αποτέλεσε η παραγωγή ειδικών αντιορών ,δηλ ειδικών αντισωμάτων για σύνδεση με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Αναπτύχθηκαν έτσι δύο κατηγορίες αντισωμάτων, που ανάλογα με ο κριτήριο της στοχευμένης ειδικότητάς τους διακρίνονται σε πολυκλωνικά και μονοκλωνικά. Τα πρώτα είναι λιγότερο εξειδικευμένα, επειδή στοχεύουν περισσότερους του ενός αντιγονικούς επίτοπους, ενώ αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν συγκεκριμένες αντιγονικές θέσεις προσδίδοντας μεγαλύτερη ειδικότητα από τα προηγούμενα. Η ανοσοιστοχημεία, σε αντίθεση με τις κλασσικές ιστοχημικές μεθόδους, βασίζεται σε αντιδράσεις με εξειδίκευση στην αναγνωρισιμότητα του αντιγονικού στόχου. Οι μη σημασμένες τεχνικές (ενζυματικές) βασίζονται στην ανοσοδραστικότητα των αντισωμάτων και στις χημικές ιδιότητες ενζύμων ή ενζυμικών συμπλεγμάτων. Αυτά αντιδρούν με αχρωμάτιστα υποστρώματα χρωμογόνων ενώσεων προς σχηματισμό ενός χρωματισμένου τελικού προϊόντος. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η υπεροξειδάση του υδρογόνου, η αλκαλική φωσφατάση και δευτερευόντος η οξειδάση της γλυκόζης. Οι κύριες μέθοδοι παρατίθενται περιληπτικά ως εξής:

1. Μέθοδος της ανοσουπεροξειδάσης
2. Μέθοδος Συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC)
3. Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης
4. Μέθοδος του ενός ή των δύο σταδίων με τη χρήση πολυμερούς δεξτράνης (EPOS ή two step method- Dako En Vision<sup>+</sup> dextran technology)

## **10. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ<sup>32,33</sup>**

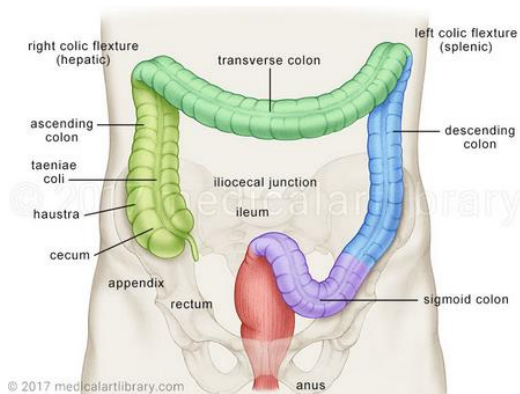
Τα συστήματα ανάλυσης εικόνας προέκυψαν ως αποτέλεσμα της αδήρητης ανάγκης για ποιοτικότερους ελέγχους στα προϊόντα υψηλής μικροτεχνολογίας (transistors, microchips) στις αρχές της δεκαετίας του 80 στον κλάδο της Ηλεκτρονικομηχανικής. Προσφέρουν τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ποιοτικού μέσω μιας ταχείας και ακριβούς εκτίμησης των μετρούμενων παραμέτρων. Οι μορφομετρικές αναλύσεις στο επίπεδο της παθολογικής ανατομικής και κυτταρολογίας αφορούν μετρήσεις απόλυτου αριθμού κυτταρικών χώρων (πχ πυρήνων) ή γεωμετρικών χαρακτηριστικών όπως διαμέτρων πυρήνων ή κυττάρων, λόγων διαμέτρων ή χώρων (N/C ratio), καθώς και πυκνομετρικές μελέτες (densitometry), όπου μετρώνται η έκταση και η οπτική πυκνότητα (βαθυχρωματικότητα) πυρηνικών ή κυτταροπλασματικών ιστοχημικών ή ανοσοιστοχημικών χρώσεων. Αναγνωρίζονται δύο ειδών συστήματα ανάλυσης εικόνας ανάλογα με την ανεξαρτησία της δραστηριότητάς τους: τα αυτόματα (full automated), τα οποία με ρομποτικούς μηχανισμούς

και βάση τροποποιημένων μακροεντολών εκτελούν τη διαχείριση και μέτρηση των επιθυμούμενων χαρακτηριστικών με απόλυτα αυτόματοποιημένο τρόπο και εκείνα τα οποία χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόματα (semi automated) στα οποία ο χειριστής-ιατρός επεμβαίνει αποκόπτοντας ή ενσωματώνοντας χώρους ενδιαφέροντος.

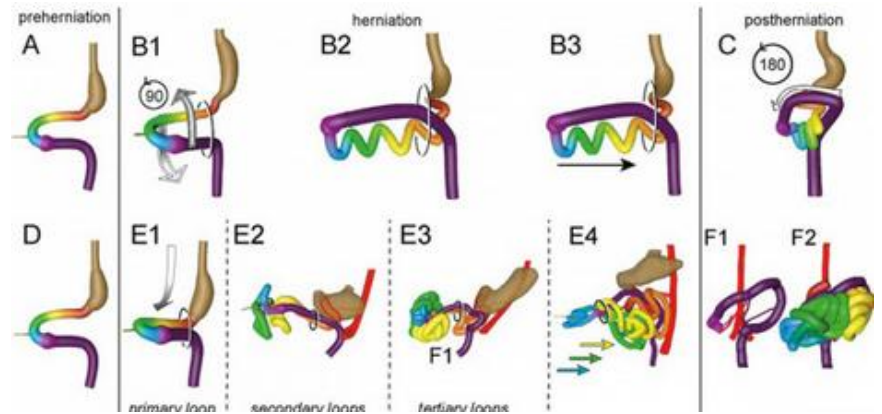
Σε κάθε ιστολογικό ή κυτταρολογικό παλκίδιο επιλέγονται αντιπροσωπευτικά πεδία υπό την επιθυμητή μεγέθυνση και υπό σταθερή ένταση φωτός και μετράται ο απόλυτος αριθμός των πυρήνων και η οπτική πυκνότητα (optical density) ή η ένταση της ανοσοιστοχημικής χρώσης (staining intensity) στα επιλεγμένα κυτταρικά υποσυστήματα (πχ μεμβράνη, κυτταρόπλασμα), αφού προηγουμένως κατασκευάζονται οι αντίστοιχες μακροεντολές δομημένες σε γλώσσα Basic για τον καθορισμό του χρωματικού εύρους (στην προκειμένη περίπτωση αποχρώσεις του καφέ λόγω DAB κατά το πρότυπο RGB (Red/Green/Blue). Η ψηφιοποιημένη εικόνα του μικροσκοπίου καταλαμβάνει σταθερό πλαίσιο μέτρησης στην οθόνη του υπολογιστή (‘‘ ενεργό κάδρο’’-active window) εκτάσεως  $16848 \mu\text{m}^2$  σε μεγέθυνση 40x, δηλ το  $\frac{1}{4}$  του οπτικού πεδίου του μικροσκοπίου. Κάθε εικονοστοιχείο (pixel) λαμβάνει μια τιμή του χρωματικού φάσματος, που αποτελεί τη συνισταμένη των προαναφερθέντων βασικών χρωμάτων. Το εύρος της οπτικής πυκνότητας στο συγκεκριμένο σύστημα καλύπτει το εύρος των τιμών από 0 (απόλυτο μαύρο ) έως 255 (απόλυτο λευκό). Κατ αυτό τον τρόπο μεταφράζεται σε κλινικό επίπεδο η συσχέτιση της έντασης της χρώσης (μειούμενες τιμές-βαθυχρωματικότητα) με τη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος (διαφοροποίηση-σταδιοποίηση).

Κατά τη διαδικασία της μέτρησης η αναλογική εικόνα του μικροσκοπίου φιλτράρεται ψηφιακά (σχηματισμός προσωρινού ή αποθηκευμένου ψηφιακού αρχείου τύπου jpeg ή TIFF) και μετά την ακινητοποίησή της, μέσω της προκατασκευασμένης μακροεντολής αποτυπώνονται οι χώροι της μέτρησης σημαινόμενοι με κάποιο χρώμα (π.χ κόκκινο), ώστε στο τελικό στάδιο, πριν δηλαδή σχηματισθεί η τελική κάρτα αποτελεσμάτων (τύπου Excel sheet), να επιτραπεί στο χειριστή η παρέμβαση μέσω ενσωμάτωσης ή αποκοπής χώρων ενδιαφέροντος, τους οποίους αγνόησε ή υπερεκτίμησε το σύστημα. Ο συνδυασμός σωστής μακροεντολής, ποιότητας χρωσμένου πλακιδίου (καθαρότητα-ειδικότητα ανοσοιστοχημικής χρώσης) και εμπειρίας του χρήστη μειώνουν δραματικά το στατιστικό σφάλμα (<5%).

## 11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΕΙΚΟΝΕΣ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ



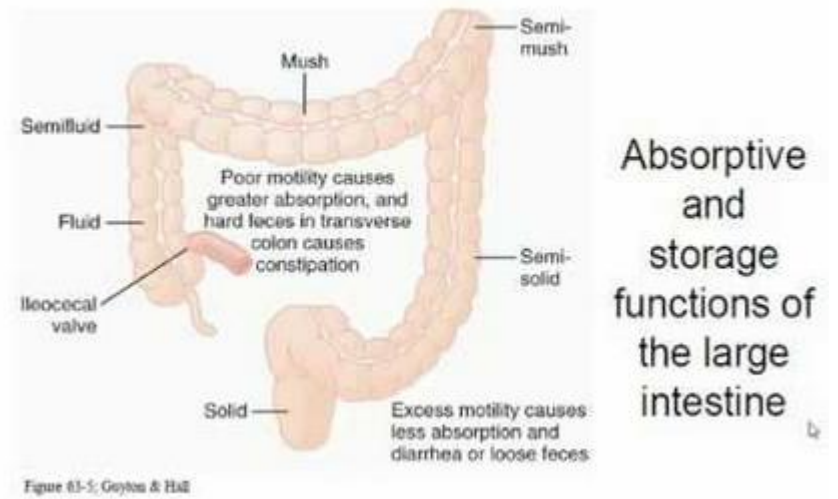
Εικόνα 1



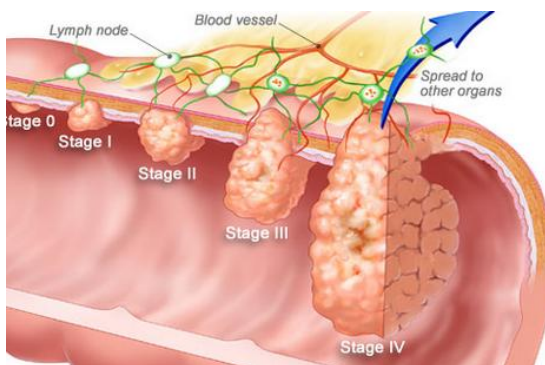
Εικόνα 2



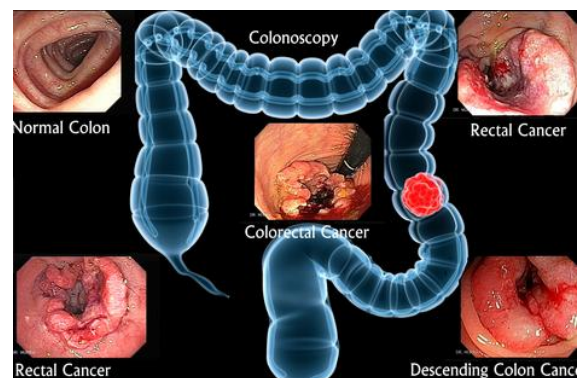
Εικόνα 3



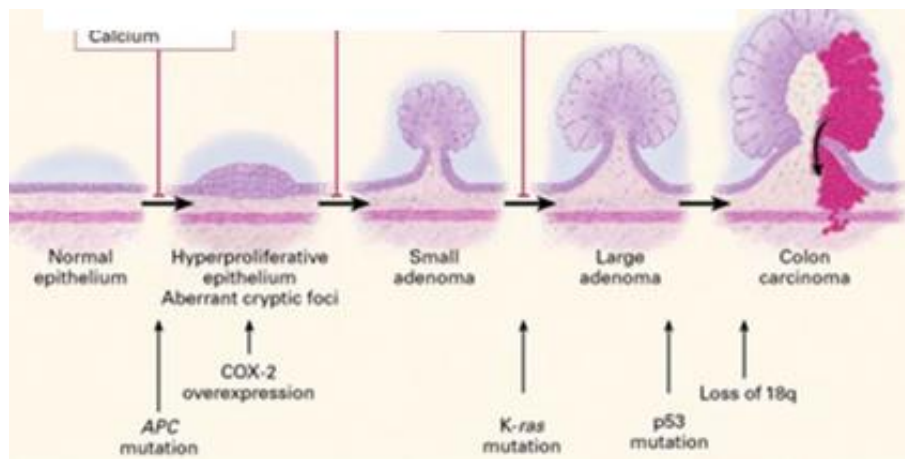
Εικόνα 4



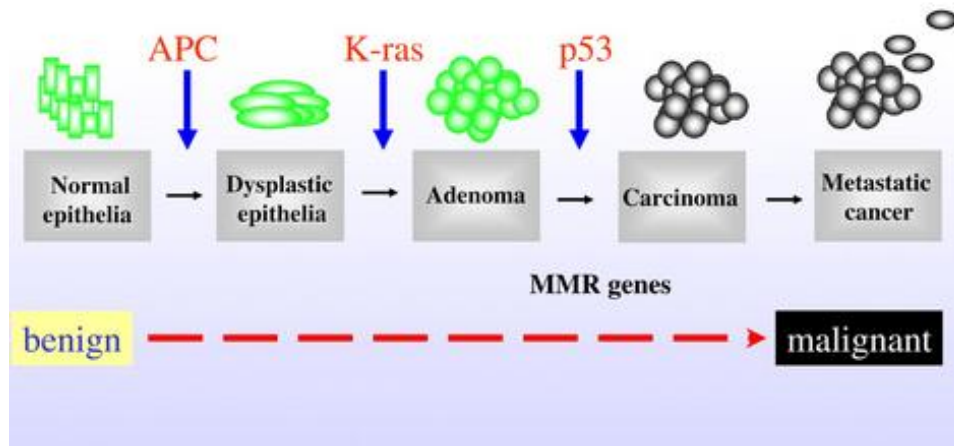
Εικόνα 5



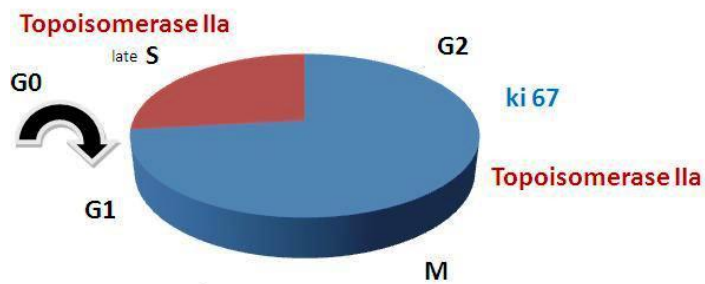
Εικόνα 6



Εικόνα 7



Εικόνα 8



Εικόνα 9

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η απορρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτείνες κομβικές στη διαδικασία καρκινογένεσης απαντάται σε επιθήλια ενός ευρέως φάσματος οργάνων. Η νεοπλασματική εκτροπή και η καρκινική μεταμόρφωση επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί μια προοδευτική, πολυσταδιακή διαδικασία στην οποία ενσωματώνονται χρωμοσωμιακές και ειδικές γονιδιακές -δομικού και αριθμητικού τύπου- αστάθειες. Ιδιαίτερα στη σύγχρονη μοριακή ιατρική, η ανίχνευση συγκεκριμένων τύπων γενετικών και επιγενετικών συμβάντων (σημειακές μεταλλάξεις, ενισχύσεις ή διαγραφές γονιδίων, πολυσωμία ή ανευπλοειδία χρωμοσωμάτων, διαταραχές μεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων) οδηγεί σε στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ειδικότερα, η διαταραχή του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε αποδιοργάνωση του πυρήνα και των φάσεών του και είναι πολύ σημαντική η αποτύπωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω έκφρασης αξιόπιστων πρωτεϊνικών δεικτών.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας τέθηκε η συγκριτική μελέτη της έκφρασης των δύο δεικτών **ki67 & topoisomerase IIa** σε αδеноκαρκινώματα του παχέος εντέρου μέσω της ήδη δημοσιευμένης βιβλιογραφίας στο PubMed καθώς και μέσω μιας περιορισμένης μελέτης της πρωτεϊνικής τους έκφρασης σε ιστικό επίπεδο.

## 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2α Προέλευση-Συλλογή-Διαχείριση του βιοπτικού υλικού

Το υλικό αναδύθηκε από την αρχειακή ιστική βάση του Παθολογοανατομικού Τμήματος του ΝΙΜΤΣ και αφορούσε σε ήδη μικροτομημένες έτοιμες για ανοσοχρώση αρχειακές τομές – είκοσι πέντε (**n=25**) σποραδικά πρωτοπαθή αδеноκαρκινώματα παχέος εντέρου, προιόντα τοπικής ή εκτεταμένης κολεκτομής, βαθμονομημένα - όσον αφορά τη διαφοροποίηση - σύμφωνα με τα ιστολογικά κριτήρια της WHO και σταδιοποιημένα σύμφωνα με το σύστημα Astler-Coller. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 5 φυσιολογικοί εντερικοί βλεννογόνοι. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα των εξεταζόμενων περιπτώσεων περιλαμβάνονται στους **Πίνακες 1,2**.



**Πίνακα 1 (ομαδοποιημένα) και Πίνακα 2 (αναλυτικά).**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά περιστατικών (ομαδοποιημένα)**

<b>n=25</b>
<b>Φύλο</b>
Άρρενες (n=13)
Θήλεις (n=12)
<b>Εντόπιση</b>
Ορθοσιγμοειδές (n=15)
Ανιόν κόλον (n=10)
<b>Βαθμός Διαφοροποίησης</b>
I (n=7)
II (n=13)
III (n=5)
<b>Σταδιοποίηση</b>
A (n=3)
B1/B2 (n=10)
C1/ C2 (n=12)
<b>Διάμετρος όγκου</b>
0-3 εκ (n=6)
4-6 εκ (n=14)
>=7 (n=5)

**2β. Εργαστηριακός αλγόριθμος μελέτης**

**ΚΥΒΟΙ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ**



**ΙΣΤΙΚΕΣ ΤΟΜΕΣ**



**ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ**



**ΨΗΦΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΑΣ**

## 1. Πρωτόκολλο Ανοσοιστοχημείας (IHC)

Σύστημα I-6000 Automated Stainer (Biogenex,USA)

Πρωτόκολλο En Vision (two step method) –DAKO Corp,Denmark

## 2γ. Κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα βιοπτικού υλικού μελέτης

Αναλυτικός Πίνακας Εξεταζόμενων περιστατικών (ανά ιστική μικροσυστοιχία)

A/A	ID	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	GRADE	STAGE	ΜΕΓΙΣΤΗ ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΟΓΚΟΥ
1	340-05	Θ	72	ANION	III	C2	6
2	322-05	A	69	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	B2	4
3	201-05	A	78	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	B2	4
4	196-05	A	61	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	I	B1	7
5	173-05	Θ	71	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	6
6	140-05	A	76	ANION	II	B2	6
7	35-05	A	81	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	5
8	33-05	Θ	61	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	B2	4
9	19--05	Θ	76	ANION	II	C2	7
10	975-05	Θ	68	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	5
11	969-05	Θ	82	ANION	III	C2	3
12	938-05	A	73	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	4
13	921-05	Θ	67	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	III	C2	6
14	908-05	Θ	73	ANION	I	B1	3
15	820-05	A	81	ANION	II	B2	4
16	793-05	Θ	53	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	3
17	600-05	Θ	58	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	III	C2	3
18	581-05	A	72	ANION	I	B2	2
19	509-05	A	67	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	I	A	2
20	1396-05	Θ	77	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	I	A	7
21	1595-05	Θ	43	ANION	III	B2	6
22	1751-05	A	74	ANION	II	C2	7



Επώαση των τομών σε διάλυμα 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 5 min

Έκπλυση με αποσταγμένο H<sub>2</sub>O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

### **Αποκάλυψη αντιγονικών θέσεων (Antigen Retrieval)**

\* Ενζυματική πέψη με ficin επί 10λέπτου στους 37° C (για HER2)

Επώαση των τομών με το πρωτοταγές αντίσωμα για 40 και 60 min, αντίστοιχα.

Έκπλυση με αποσταγμένο H<sub>2</sub>O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

### **Σύνδεση με το σύμπλεγμα Υπεροξειδάσης-Πολυμερούς (Peroxidase Labelled Polymer)**

Επώαση των τομών με διάλυμα σημασμένης με πολυμερές δεξτράνης Υπεροξειδάσης (Horseradish peroxidase labeled polymer-HRP LP)

Έκπλυση με αποσταγμένο H<sub>2</sub>O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

Προσθήκη 3 σταγόνων διαλύματος χρωμογόνου DAB για 30 min

Έκπλυση με αποσταγμένο H<sub>2</sub>O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

### **Αντίχρωση και Επικάλυψη**

Εμβάπτιση σε διάλυμα Αιματοξυλίνης (Hematoxylin MAYRES-water based ) για 5-10 δευτερόλεπτα

Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης για 2-3 min

Προοδευτική αφυδάτωση (Dehydration with graded alcohol)

70% Αιθανόλη                      εμβάπτιση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου

85% Αιθανόλη                      εμβάπτιση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου

96% Αιθανόλη                      εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

100% Αιθανόλη                      εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

Εμβάπτιση σε καθαρή Ξυλόλη για 2-3 min x 3 φορές και επικόλληση καλυπτρίδων (επικάλυψη με Histomount αμέσως πριν εξατμιστεί η Ξυλόλη).

Η όλη διαδικασία, η οποία βασίζεται στην παράκαμψη της δέσμευσης με τη βιοτίνη αποδίδοντας καθαρότερο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε με το αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας Bond, Menarini, It. Ως αποδεκτή κρίθηκε για τις πρωτεΐνες ki 67 και Topoisomerase IIa η πυρηνική και εστιακά περιπυρηνική ανοσοχρώση.

### **Πρωτόκολλο υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας**

Η αντικειμενική εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των δεικτών πραγματοποιήθηκε με σύστημα ψηφιακής ανάλυσης εικόνας με τα χαρακτηριστικά: Intel Pentium Dual-Core, Digital Camera Sony Cyber-shot (5mPx digital analysis), Microscope Olympus CX-31 και με την εφαρμογή λογισμικού: Windows XP/ NIS-elements image analysis software, Nikon, Jp, 2009. Συγκροτήθηκε από κάθε ιστικό δείγμα χρωσμένο ανοσοϊστοχημικά μια δεξαμενή 5 ψηφιακών εικόνων προς μέτρηση σε μεγέθυνση x10. Μετρήθηκε μέσω μακροεντολής ο αριθμός των ανοσοχρωσμένων πυρήνων και με βάση το επίπεδο της έντασης της χρώσης επί ενδογενών μαρτύρων (μη χρωσμένοι έως υπερχρωσμένοι πυρήνες). Το φάσμα των συνεχών τιμών καλύπτει 0 (απόλυτη υπερέκφραση πρωτεΐνης) -255 (απόλυτη απουσία έκφρασης) κατά το πρότυπο RGB (combined Red, Green, Blue colors per pixel).

### **Ομαδοποίηση (grouping) τιμών ψηφιακής ανάλυσης εικόνας για την αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης**

MARKER	ΠΡΟΤΥΠΟ ΧΡΩΣΗΣ	HIGH	MODERATE	LOW	NEGATIVE
Topoisomerase IIa	N-P/N	86-101	109-137	141-159	>159
Ki 67	N-P/N	87-109	112-141	146-158	>158

N/PN: ΠΥΡΗΝΙΚΗ/ΠΕΡΙΠΥΡΗΝΙΚΗ NUCLEAR LABELLING INDEX (NLI)

### 3.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του λογισμικού στατιστικής SPSS version 11.0. Εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες Chi Square test και kappa analysis για τη διενέργεια των συγκρίσεων μεταξύ των της ανοσοιστοχημικής και μοριακής ανάλυσης και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων, αντίστοιχα. Οι κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβαναν το φύλο, το βαθμό διαφοροποίησης, το στάδιο της νόσου, την τοπογραφία των όγκων, καθώς και τη μέγιστη διάμετρο. Τέλος, ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ανωτέρω συσχετίσεων ορίστηκε  $p < 0,05$ .

#### Πίνακας αποτελεσμάτων

A/A	ID	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	GRADE	STAGE	ΜΕΓ ΔΙΑΜ ΟΓΚΟΥ	Τopo Πα	Ki 67
1	340-05	Θ	72	ANION	III	C2	6	H	H
2	322-05	A	69	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	B2	4	M	M
3	201-05	A	78	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	B2	4	L	L
4	196-05	A	61	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	I	B1	7	M	L
5	173-05	Θ	71	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	6	M	H
6	140-05	A	76	ANION	II	B2	6	L	L
7	35-05	A	81	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	5	M	H
8	33-05	Θ	61	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	B2	4	L	L
9	19--05	Θ	76	ANION	II	C2	7	M	L
10	975-05	Θ	68	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	5	M	M
11	969-05	Θ	82	ANION	III	C2	3	H	H
12	938-05	A	73	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	4	M	L
13	921-05	Θ	67	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	III	C2	6	H	H
14	908-05	Θ	73	ANION	I	B1	3	L	M
15	820-05	A	81	ANION	II	B2	4	L	M
16	793-05	Θ	53	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	3	M	M
17	600-05	Θ	58	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	III	C2	3	H	M
18	581-05	A	72	ANION	I	B2	2	L	L

19	509-05	A	67	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	I	A	2	L	L
20	1396-05	Θ	77	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	I	A	7	L	M
21	1595-05	Θ	43	ANION	III	B2	6	M	H
22	1751-05	A	74	ANION	II	C2	7	M	H
23	1871-05	A	81	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	I	B1	5	L	L
24	2066-05	A	78	ANION	I	A	4	L	L
25	2149-05	A	59	ΟΡΘΟΣΙΓΜ	II	C2	6	L	M

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

### Correlation analysis:

In order to perform the correlation analysis between the key variables, we are using the Statistics software SPSS.

The first step for this process is to convert all non-numerical variables into numerical values in SPSS. This can be performed using the “Recode into different variables” (clicking “Transform” in the SPSS menu). Those values can be arbitrary, nevertheless, they should convey a sense of logical sequence, which will allow to easily understand the correlation index.

### Variables and possible values:

Fyllo	Ilikia	Entopisi	Grade	Stage	Meg diam	Topol	Ki67
Male	“values”	AN	I	A	“values”	L	L
Female		OP	II	B1		M	M
			III	B2		H	H
				C2			

### 1) Defining numerical values for the variables

**Gender:** Male = 0  
Female = 1

**Entopisi:** OP = 0  
AN = 1

**Grade:** I = 1  
II = 2  
III = 3

**Stage:** A = 1  
B = 2

	B1 = 3
	B2 = 4
	C2 = 5
<b>Topol:</b>	L = 1
	M = 2
	H = 3
<b>Ki67:</b>	L = 1
	M = 2
	H = 3

## 2) Performing the correlation

Using the standard Bivariate correlation function in SPSS ("Analyze" → "Correlate"), we can identify the correlation level between 2 variables.

**The desired correlations are:**

- 1) Topo with Gender
- 2) Topo and entop
- 3) Topo and grade
- 4) Topo and stage
- 5) Topo and max diam
- 6) Ki67 and gender
- 7) Ki67 and entop
- 8) Ki67 and grade
- 9) Ki67 and stage
- 10) Ki67 and max diam

The correlation can be positive (or negative), meaning that when one variable is increasing, the other is increasing (or decreasing). The correlation index is  $>0$  in positive correlations, and  $<0$  in negative correlations. The value can be only between -1 and 1. The correlation is stronger when the index is closer to 1 (or -1) and weaker when closer to 0.



### 3) Results

#### 1) Topo with Gender

Correlations			
		topol_conv	fullo_conv
topo_conv	Pearson Correlation	1	.483
	Sig. (2-tailed)		.014
	N	25	25
fullo_conv	Pearson Correlation	.483	1
	Sig. (2-tailed)	.014	
	N	25	25

The correlation is relatively strong positive, with value 0.483. This means that, as Topol numerical value increases (ie. Goes from Low = 1 to High = 3), the numerical value of the Gender increases (ie. Goes from Male = 0, to Female = 1). The reversed assumption is also correct. So Females have are more possible for higher value of topol

\*same approach and interpretation of the results is repeated below

#### 2) Topo and entop

Correlations			
		topol_conv	Entop_conv
topo_conv	Pearson Correlation	1	-.023
	Sig. (2-tailed)		.915
	N	25	25
Entop_conv	Pearson Correlation	-.023	1
	Sig. (2-tailed)	.915	
	N	25	25

Light negative correlation. Not significant

#### 3) Topo and grade

Correlations			
		topol_conv	grade
topo_conv	Pearson Correlation	1	.760
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	25	25
grade	Pearson Correlation	.760	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	25	25

Strong positive correlation. The higher the topol, the higher the grade

#### 4) Topo and stage

##### Correlations

		topo	Stage_conv
topo_conv	Pearson Correlation	1	.562
	Sig. (2-tailed)		.003
	N	25	25
Stage_conv	Pearson Correlation	.562	1
	Sig. (2-tailed)	.003	
	N	25	25

Average positive correlation. The higher the topol, the higher the stage

#### 5) Topo and max diam

##### Correlations

		topol	Max diam
topol_conv	Pearson Correlation	1	.154
	Sig. (2-tailed)		.463
	N	25	25
MEΓ ΔIAM OFKOY	Pearson Correlation	.154	1
	Sig. (2-tailed)	.463	
	N	25	25

Very weak positive correlation. Not significant

#### 6) Ki67 and gender

##### Correlations

		Ki67	Gender
Ki67_conv	Pearson Correlation	1	.436
	Sig. (2-tailed)		.029
	N	25	25
fullo_conv	Pearson Correlation	.436	1
	Sig. (2-tailed)	.029	
	N	25	25

**\*\*.**Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Average positive correlation. The higher the Ki67, the higher the gender (going from male to female). Hence, females have more possibilities for higher Ki67 value

#### 7) Ki67 and entop

##### **Correlations**

		Ki67	entop
Ki67_conv	Pearson Correlation	1	.120
	Sig. (2-tailed)		.567
	N	25	25
Entop_conv	Pearson Correlation	.120	1
	Sig. (2-tailed)	.567	
	N	25	25

Weak positive correlation

#### 8) Ki67 and grade

##### **Correlations**

		Ki67	grade
Ki67_conv	Pearson Correlation	1	.624
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	25	25
grade	Pearson Correlation	.624	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	25	25

**\*\*.** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Good positive correlation. The higher the Ki67, the higher the grade

#### 9) Ki67 and stage

##### **Correlations**

		Ki67	stage
Ki67_conv	Pearson Correlation	1	.374
	Sig. (2-tailed)		.066
	N	25	25
Stage_conv	Pearson Correlation	.374	1

	Sig. (2-tailed)	.066	
	N	25	25

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).  
Average – weak positive correlation

#### 10) Ki67 and max diam

##### Correlations

		Ki67	Max diam
Ki67_conv	Pearson Correlation	1	.261
	Sig. (2-tailed)		.208
	N	25	25
ΜΕΓ ΔΙΑΜ ΟΓΚΟΥ	Pearson Correlation	.261	1
	Sig. (2-tailed)	.208	
	N	25	25

Weak positive correlation

#### 11) Topo and Ki67

##### Correlations

		Topol	Ki67
topo_conv	Pearson Correlation	1	.622
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	25	25
Ki67_conv	Pearson Correlation	.622	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	25	25

Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Medium-strong positive correlation. The higher the topo1, quite probably the higher the ki67

Με βάση την ανάλυση της έκφρασης των εξεταζόμενων δεικτών, υπερέκφραση της Topo 1a και ki 67 αντίστοιχα παρατηρήθηκε σε 14/25 (56%) και 15/25 (60%). Ειδικότερα, υψηλή υπερέκφραση (H NLI values) παρατηρήθηκε σε 4/14 (28.5%) και 7/14 (50%), αντίστοιχα. Η εκτεταμένη στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της Topo 1a και του φύλου των ασθενών (p=.014), του βαθμού διαφοροποίησης

grade ( $p=.001$ ), καθώς και του βαθμού σταδιοποίησης stage ( $p=.003$ ). Όσον αφορά τη συνολική έκφραση του ki 67 παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του μορίου και του φύλου των ασθενών ( $p=.029$ ), του βαθμού διαφοροποίησης grade ( $p=.001$ ), και οριακά του βαθμού σταδιοποίησης stage ( $p=.066$ ). Η συνολική συγκριτική στατιστική της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών μεταξύ τους απέβη σημαντική ( $p=.001$ ). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των μορίων και της εντόπισης του κακοήθους νεοπλασματος όπως και της διαμέτρου του.

#### 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η απώλεια της ισορροπίας μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αποπτωτικού θανάτου αποτελεί σημαντικό γεγονός στην καρκινογενετική διαδικασία και εξέλιξη της κακοήθους εξαλλαγής ενός νεοπλασματικού όγκου. Στους όγκους τα επιθήλια χαρακτηρίζονται από αυξημένο μιτωτικό δείκτη και ενσωματώνουν αδρές αριθμητικές ή δομικού τύπου χρωμοσωμιακές ανωμαλίες (πομπυλοειδία/μονοσωμία) και ειδικές γονιδιακές αστάθειες (μεταλλάξεις, διαγραφές, ενισχύσεις, διαμεταθέσεις). Μόρια τα οποία σχετίζονται με την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι τα ki-67 (cytogenetic band: 10q26.2) και Topoisomerase IIα (cytogenetic band: 17q21.2)<sup>34-39</sup>. Και οι δυο αυτές πρωτείνες εμφανίζουν ίδιο πρότυπο έκφρασης (πυρηνική/περιπυρηνική χρώση) Nuclear Labeling Index (NLI) και διαφορετικά ποσοστά έκφρασης σε κακοήθεις όγκους όπως το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. Η πρωτεΐνη ki-67 εκφράζεται σε όλες τις φάσεις πλην της G<sub>0</sub>, με την αιχμή της έκφρασης να εμφανίζεται στις G<sub>2</sub>/M, ενώ η Topo IIα σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα στο μέσο και τέλος της S φάσης, όπως και στις G<sub>2</sub>/M. Στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου υψηλά επίπεδα έκφρασης του μορίου συσχετίζονται με προχωρημένη νόσο και επιθετική βιολογική συμπεριφορά του νεοπλασματος, ενώ παράλληλα τροποποιημένα εμφανίζονται τα ποσοστά ανταπόκρισης των αντίστοιχων ασθενών σε στοχευμένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως η δοξορουβικίνη, αναστολέας της Topo IIα<sup>40-43</sup>.

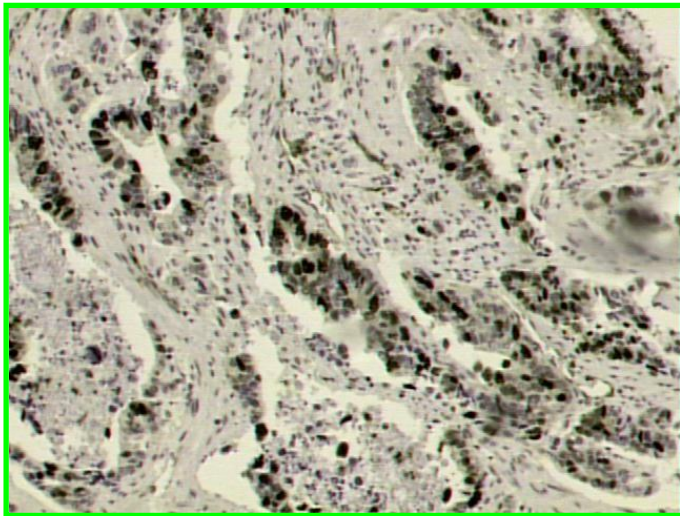
Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική ανάλυση των μορίων μέσω ανοσοιστοχημείας. Υψηλά ποσοστά έκφρασης ανευρέθησαν και στα δύο μόρια. Η εκτεταμένη στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της Topo IIα και του φύλου των ασθενών του βαθμού διαφοροποίησης grade, καθώς και του βαθμού σταδιοποίησης stage. Όσον αφορά τη συνολική έκφραση του ki 67 παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του μορίου και του φύλου των ασθενών, του βαθμού διαφοροποίησης grade, και οριακά του βαθμού σταδιοποίησης stage.

Η συνολική συγκριτική στατιστική της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών μεταξύ τους απέβη σημαντική. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των μορίων και της εντόπισης του κακοήθους νεοπλάσματος όπως και της διαμέτρου του. Παρεμφερείς μελέτες έχουν αναδείξει την αξία της εκτίμησης της έκφρασης των μορίων αυτών στην πρόγνωση των ασθενών καθώς και ειδικά της Τορο Πα στην ανταπόκριση σε συγκεκριμένα ογκολογικά φάρμακα<sup>44-46</sup>. Αυτό συμβαίνει σε συνδυασμό και με την τροποποίηση πρωτεϊνών όπως του καρκινοεμβρυικού αντιγόνου, του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16, του EGFR και άλλων μορίων που αλληλεπιδρούν σε ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής του σήματος από την περιφέρεια προς τον πυρήνα<sup>47,48</sup>. Επίσης οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζουν και σύνθετα θεραπευτικά σχήματα με την ενσωμάτωση φαρμάκων όπως fluorouracil/cyclophosphamide και carboplatin/paclitaxel<sup>49-51</sup>.

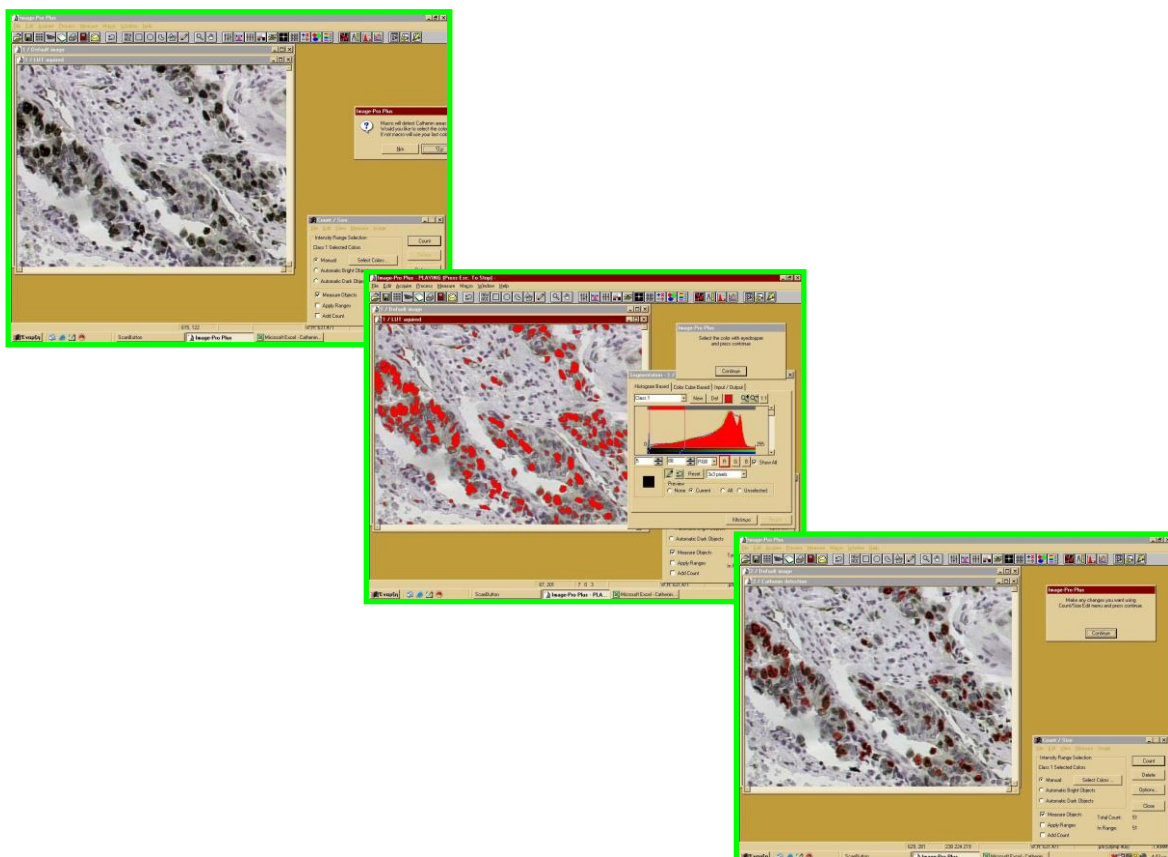
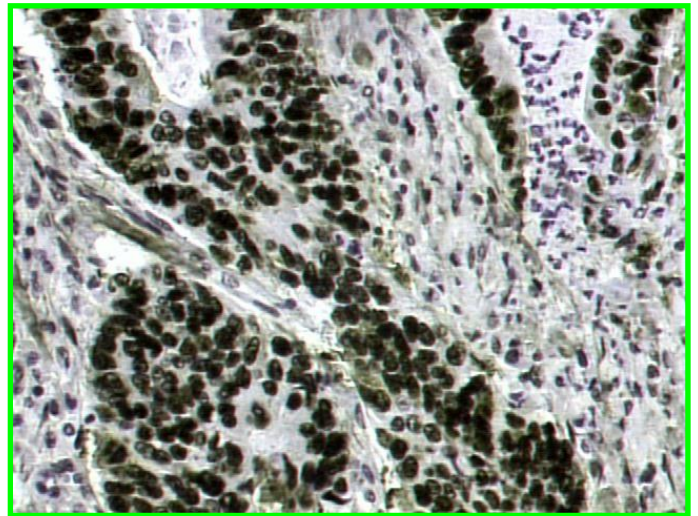
Συμπερασματικά τα δύο αυτά μόρια αποτελούν κομβικές παραμέτρους για την εκτίμηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, με την Τορο Πα να προβάλλει περισσότερο ειδική καθώς η έκφρασή της εστιάζεται σε ένα υποσύνολο των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, κυρίως στην S και G2/M φάσεις που συνδέονται άμεσα με το διπλασιασμό του DNA του κυττάρου.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΕΙΚΟΝΕΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Topoisomerase II (πυρηνική έκφραση, 100x)



ki 67 (πυρηνική έκφραση, 400x)



Ψηφιακή ανάλυση έκφρασης Topoisomerase II σε ιστικό δείγμα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (REFERENCES)

1. Kumar, Vinay (2010). "17 - Polyps". Robbins and Cotran pathologic basis of disease. (8th ed. ed.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. ISBN 978-1-4160-3121-5
2. Jemal A, Bray, F, Center, MM, Ferlay, J, Ward, E, Forman, D (2011). "Global cancer statistics". CA: a cancer journal for clinicians 61 (2): 69–90. doi:10.3322/caac.20107.PMID 21296855
3. Colorectal Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008 — Summary. Available from: Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.
4. Markowitz SD, Bertagnolli MM (December 2009)."Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer". N. Engl. J. Med. 361 (25): 2449–60.doi:10.1056/NEJMra0804588. PMC 2843693.PMID 20018966.
- 5.He J, Efron, JE (2011). "Screening for colorectal cancer.".Advances in surgery 45: 31–44. PMID 21954677.Jaffe, LF (2003). "Epigenetic theories of cancer initiation".Advances in cancer research. Advances in Cancer Research90: 209–30. doi:10.1016/S0065-230X(03)90007-8. ISBN 978-0-12-006690-. PMID 14710952
6. López-Lázaro, M (2010). "A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy". Molecular medicine 16 (3–4): 144–153.doi:10.2119/molmed.2009.00162. PMC 2802554.PMID 20062820
- 7.Knudson A (1971). "Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma". Proc Natl Acad Sci USA 68 (4): 820–3.doi:10.1073/pnas.68.4.820. PMC 389051.PMID 5279523.
- 8.Dalerba, P.; Cho, R. W.; Clarke, M. F. (2007). "Cancer stem cells: models and concepts". Annu. Rev. Med. 58: 267–284.doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854.PMID 17002552.
- 9.Yan L, Beckman RA (October 2005). "Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development". BioTechniques 39 (4): 565–8.doi:10.2144/000112043. PMID 16235569
- 10.Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P (April 2009). "Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer". N. Engl. J. Med. 360(14): 1408–17. doi:10.1056/NEJMoa0805019.PMID 19339720.
11. McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. Arch Pathol Lab Med.109:716-721, 1985



12. Chan JK. Advances in Immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol.* 17:170-177,2000
13. J. A. Ramos-Vara, "Technical Aspects of Immunohistochemistry," *Veterinary Pathology Online*, vol. 42, no. 4, pp. 405-426, Jul. 2005
14. Watson AJ, Collins, PD (2011). "Colon cancer: a civilization disorder.". *Digestive diseases* (Basel, Switzerland) 29 (2): 222–8. doi:10.1159/000323926. PMID 21734388.
15. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 430–440
16. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 2001; 70: 369–413
17. Schoeffler AJ, Berger JM. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q. Rev. Biophys.* 2008; 41: 41–101
18. Nielsen KV, Brunner N. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 352–353
19. Valkov NI, Sullivan DM. Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. *Drug Resistance Updates* 2003; 6: 27–39
20. Mouawad F, Gros A, Rysman B et al. The antitumor drug F14512 enhances cisplatin and ionizing radiation effects in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Oral Oncol.* 2014; 50(2):113-9
21. Kanazawa T, Mizukami H, Nishino H et al. Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int J Oncol.* 2004; 25(3):729-35
22. Horibe Y, Murakami M, Komori K, Imaeda Y, Kasahara M. Expression of topoisomerase II alpha, Ki-67 and p53 in early stage laryngeal carcinomas not featuring vocal cord fixation. *APMIS.* 2000; 108(10):689-96
23. Oliveira-Costa JP, Oliveira LR, da Silveira GG, Soave DF, Soares FA, Ribeiro-Silva A. Topoisomerase expression in oral squamous cell carcinoma: relationship with cancer stem cells profiles and lymph node metastasis. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41(10):762-8
24. Shvero J, Koren R, Shvili I, Yaniv E, Sadov R, Hadar T. Expression of human DNA Topoisomerase II-alpha in squamous cell carcinoma of the larynx and its correlation with clinicopathologic variables. *Am J Clin Pathol.* 2008 ;130(6):934-9
25. Hanagiri T, Ono K, Kuwata T, et al. Evaluation of topoisomerase I/topoisomerase IIalpha status in esophageal cancer. *J UOEH.* 2011; 33(3):205-16

26. Smith DH, Christensen IJ, Jensen NF, et al. Mechanisms of Topoisomerase I (TOP1) Gene Copy Number Increase in a Stage III Colorectal Cancer Patient Cohort. *PLOS* 2013; 8: 606013-17
27. Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, et al. Topoisomerase II $\alpha$  expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(7):1029-37
28. Cai X, Qi WX, Wang L, Zhang Z. Correlation of multiple proteins with clinic-pathological features and its prognostic significance in colorectal cancer with signet-ring cell component. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016 Aug;20(16):3358-67
29. Mărgaritescu C, Pirici D, Cherciu I, Bărbălan A, Cărtână T, Săftoiu A. CD133/CD166/Ki-67 triple immunofluorescence assessment for putative cancer stem cells in colon carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2014 Jun;23(2):161-70
30. Jung JH, Kwon HJ, Kim TJ, Cho HJ, Kim HK, Cheung DY, Kim JI, Kim JK. [Immunohistochemical expression of p53, Bcl-2, and Ki-67 proteins in traditional serrated adenomas of colon]. *Korean J Gastroenterol*. 2013 Dec;62(6):336-43
31. Stromar IK, Jakic-Razumovic J. The value of immunohistochemical determination of topoisomerase II $\alpha$  and Ki67 as markers of cell proliferation and malignant transformation in colonic mucosa. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Aug;22(7):524-9
32. Ceaușu RA, Cîmpean AM, Gaje P, Gurzu S, Jung I, Raica M. CD105/Ki67 double immunostaining expression in liver metastasis from colon carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):613-6
33. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144: 646-674
34. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67
35. Koketsu S, Watanabe T, Tada T, Kanazawa T, Ueda E, Nagawa H. Sporadic colorectal cancer in elderly people. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1749-52
36. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70
37. Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS et al. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability-an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 841
38. Duchrow M, Gerdes J, Schluter C. The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. *Cell Prolif* 1994;27:235-42

- 39.Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2002;182:311–22
- 40.Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. 2016; 535(7611):308-12
- 41.Kumar GS, Gokhan E, De Munter S et al. he Ki-67 and RepoMan mitotic phosphatases assemble via an identical, yet novel mechanism. *Elife*. 2016;5: e16539-64
- 42.Booth DG, Takagi M, Sanchez-Pulido L et al. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Elife*. 2014; 3:e01641-46
- 43.Reimers MS, Zeestraten EC, van Alphen TC et al. Combined analysis of biomarkers of proliferation and apoptosis in colon cancer: an immunohistochemistry-based study using tissue microarray. *Int J Colorectal Dis*. 2014; 29(9):1043-52
- 44.Peng Y, Wang L, Gu J. Elevated preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) and Ki67 is predictor of decreased survival in IIA stage colon cancer. *World J Surg*. 2013; 37(1):208-13
- 45.Juniku-Shkololli A, Manxhuka-Kerliu S, Ahmetaj H, Khare V, Zekaj S. Expression of immunohistochemical markers of progression in pre-cancerous and cancerous human colon: correlation with serum vitamin D levels. *Anticancer Res*. 2015;35(3):1513-20
- 46.Hisamatsu K, Noguchi K, Tomita H et al. Distinctive crypt shape in a sessile serrated adenoma/polyp: Distribution of Ki67-, p16INK4a-, WNT5A-positive cells and intraepithelial lymphocytes. *Oncol Rep*. 2017;38(2):775-784
- 47.Heck MM, Earnshaw WC. Topoisomerase IIa, a specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* 1986;103:2569–81
- 48.Mueller RE, Parkes PK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOPO2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:288–97
- 49.Tsiambas E, Alexopoulou D, Lambropoulou S, Gerontopoulos K, Karakitsos P, Karameris A. Targeting topoisomerase IIa in endometrial adenocarcinoma: a combined chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry study based on tissue microarrays. *Int J Gynecol Cancer*.;16(3):1424-31
- 50.Lazaris AC, Kavantzias NG, Zorzos HS, Tsavaris NV, Davaris PS. Markers of drug resistance in relapsing colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002; 128(2):114-8
- 51.Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P et al. HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2007; 60(7):768-72