

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ- ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΚΑΙ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΟ-ΗΠΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ ΗΛΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ II
ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ
ΓΕΩΡΓΙΟΥ Δ. ΑΓΙΟΜΑΜΙΤΗ

ΚΡΗΤΗ
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2015

Η διατριβή αυτή αφιερώνεται
στη οικογένεια μου και στους δασκάλους μου.

Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 13/03/2003

Ορισμός τριμελούς επιτροπής: 13/3/2003

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Επιβλέπων: Η. Κουρούμαλης, Μέλη: Γ. Κολιός, Γ. Μουζάς

Ημερομηνία Υποστηρίξεως διατριβής: 27/01/2015

Ορισμός επταμελούς επιτροπής: 12/02/2014

Μέλη επταμελούς επιτροπής: Η. Κουρούμαλης, Ι. Μουζάς, Γ. Κολιός, Γ. Χαλκιαδάκης,
Ι. Ρωμανός, Ι. Κουτρομπάκης, Γ. Νότας

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Ηρακλείου Κρήτης δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα
(Νόμος 5543/1932, άρθρον 202, παράγραφος 2)

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ 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 ΕΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΣΕΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΣΕΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΣΕΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΣΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ. ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΣΕΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΕΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΕΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΕΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΕΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΛΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΣΕΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Δημοσιεύσεις που στηρίζουν τα αποτελέσματα της διατριβής.....	15
2. Παρουσιάσεις σε συνέδρια που στηρίζουν τα αποτελέσματα της διατριβής.....	16
3. Βιογραφικό σημείωμα.....	19
4. Πρόλογος-ευχαριστίες.....	41
5. Περίληψη.....	43
6. Αγγλική περίληψη (Abstract)	47

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... 51

1. Παθογένεια Ορθοκολικού Καρκίνου (ΟΚΚ)	53
1.1 Επιδημιολογία.....	53
1.2 Αιτιολογία ανάπτυξης ΟΚΚ.....	54
1.2.1 Γενετικοί Παράγοντες.....	54
1.2.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες.....	56
1.3 Παθολογία.....	57
1.4 Παθογένεια – Φαινότυπος.....	59
1.5 Παθογένεια – Γονότυπος.....	61
1.5.1 Γενετική αστάθεια.....	62
1.5.1.1 Το μονοπάτι της χρωμοσωμική αστάθειας - Chromosomal Instability pathway (CIN)	64
1.5.1.2 Το μονοπάτι CpG - island methylator phenotype (CIMP).....	66
1.5.1.3 Το μονοπάτι μικροδορυφορικής αστάθειας - Microsatellite instability pathway (MSI)	66
1.5.1.4 Το οδοντωτό (serrated) μονοπάτι.....	67
1.5.2 Ο ρόλος της φλεγμονής.....	69
1.5.3 Κλινικοπαθολογικοί συσχετισμοί.....	71
1.5.4 Μεταλλαγές σε συγκεκριμένα μονοπάτια.....	71
1.5.4.1 Το μονοπάτι TGF-β.....	72
1.5.4.2 Ελλειψη ετεροζυγωτίας (LOH) του 18q.....	72
1.5.4.3 Το μονοπάτι p53.....	73
1.5.4.4 Το μονοπάτι EGFR.....	73
1.5.5 Μοριακοί βιολογικοί δείκτες.....	74
1.5.6 Προγνωστικοί δείκτες.....	76

2. Μοριακοί ανοσοϊστοχημικοί δείκτες (Ki67, Bcl-2, p53)	79
2.1 Ανοσοϊστοχημεία.....	79
2.2 Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες.....	80
2.2.1 Ki-67.....	80
2.2.2 Bcl-2.....	84
2.2.3 p-53.....	88
3. Τελομερές, Τελομεραση και ΟΚΚ	95
3.1 Τελομερές.....	95
3.1.1 Δομή και λειτουργία τελομερούς.....	95
3.1.2 Τελομερές, προστάτης των χρωμοσωμικών άκρων.....	96
3.2 Τελομεράση.....	101
3.2.1 Δομή και λειτουργία της τελομεράσης.....	101
3.2.2 Ενεργότητα τελομεράσης και ογκογένεση.....	104
3.2.3 Θεραπευτική της τελομεράσης.....	106
4. Κυκλοξυγενάση-2 (COX-2) και Προσταγλανδίνη E2 (PGE2)	109
4.1 Κυκλοξυγενάσες.....	109
4.1.1 Εισαγωγή Κυκλοξυγενάση-2.....	109
4.1.2 Μεταβολισμός Κυκλοξυγενάσης: ταξινόμηση προσταγλανδινών.....	110
4.1.3 Κυκλοξυγενάση-2 και καρκίνος γαστρεντερικού.....	111
4.2 Προσταγλανδίνες.....	113
4.2.1 Προσταγλανδίνες στην ανάπτυξη & εξέλιξη κακοηθειών του γαστρεντερικού.....	113
4.2.1.1 Το μονοπάτι της προσταγλανδίνης E2 (PGE2)	113
5. Τροφικοί παραγοντες (ινσουλίνη, IGF), σωματοστατίνη (οκτεροτιδη)	115
5.1 Ινσουλίνη.....	115
5.1.1 Σηματοδότηση της ινσουλίνης.....	117
5.1.2 Μεταβολική δράση της ινσουλίνης.....	117
5.1.3 Παρακρινική δράση της ινσουλίνης.....	119
5.1.4 Άλλες ενέργειες της ινσουλίνης.....	119
5.1.5 Ινσουλίνη και καρκίνος.....	121
5.1.5.1 Αντίσταση στην ινσουλίνη και καρκινογένεση: ο ρόλος της ινσουλίνης.....	121
5.2 IGF-1.....	123
5.3 Σωματοστατίνη.....	125

5.3.1	Οι υποδοχείς σωματοστατίνης και ο σηματοδοτικός καταρράκτης.....	126
5.3.1.1	Αντίεκκρηκτική δράση σωματοστατίνης.....	126
5.3.1.2	Δράσεις σωματοστατίνης έναντι του πολλαπλασιασμού.....	127
5.3.1.3	Η άμεση οδός αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης των υποδοχέων σωματοστατίνης.....	127
5.3.1.4	Έμμεση οδός αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης της σωματοστατίνης.....	129
5.3.2	Ανάλογα σωματοστατίνης.....	129
5.3.2.1	Στόχευση ανάλογων-σωματοστατίνης σε μονό-υποδοχέα	129
5.3.2.2	Αντί-πολλαπλασιαστική θεραπεία με ανάλογα-σωματοστατίνης με στόχευση σε μονό υποδοχέα.....	130
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1 (In-vivo ερευνητικό πρωτόκολλο).....		133
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΚΑΙ ΟΡΘΟΥ.....	135
6.1	Εισαγωγή.....	135
6.2	Μέθοδοι.....	137
6.2.1	Ασθενείς.....	137
6.2.2	Ενεργότητα Τελομεράσης.....	138
6.2.3	Παθολογία.....	139
6.3	Στατιστική Ανάλυση.....	141
6.4	Αποτελέσματα.....	141
6.4.1	Ασθενείς.....	141
6.4.2	Ενεργότητα της τελομεράσης σε καρκίνο συγκρινόμενη με τον φυσιολογικό ιστό.	142
6.4.3	Ενεργότητα της τελομεράσης και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.....	143
6.4.4	Μικροδορυφορική αστάθεια (MSI)	147
6.4.5	Συσχετίσεις με επίπεδο επιβίωσης.....	150
6.5	Συζήτηση.....	151
6.6	Συμπεράσματα.....	157

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΗΣ E2 (PGE2) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ-2 (COX-2) ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΙΣΤΟ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΗΝ hTERT.....	159
7.1 Εισαγωγή.....	159
7.2 Μέθοδοι.....	161
7.2.1 Ασθενείς.....	161
7.2.2 Σύνθεση PGE2 (Prostaglandin E ₂).....	161
7.2.3 Παθολογία.....	163
7.3 Στατιστική Ανάλυση.....	164
7.4 Αποτελέσματα.....	164
7.4.1 Ασθενείς.....	164
7.4.2 Ανοσοιστοχημική έκφραση της COX-2 στους καρκινικούς ιστούς και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με ΟΚΚ.....	164
7.4.3 Επίπεδο σύνθεσης της PGE2 στον ΟΚΚ συγκρινόμενη με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.....	167
7.4.4 Σύνθεση PGE2 και η σχέση της με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.....	168
7.4.5 Όταν οι όγκοι χωρίστηκαν σε όγκους δεξιού κόλου και αριστερού κόλου, μελετήθηκε η σύνθεση της PGE2 και συγκρίθηκε με την ενεργότητα της τελομεράσης.....	170
7.4.6 Συσχέτιση της σύνθεσης της PGE2 με το στάδιο νόσου (κατά Dukes) στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό ασθενών με ΟΚΚ.....	171
7.5 Συζήτηση.....	171
7.6 Συμπεράσματα.....	177

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 2 (In-vitro ερευνητικό πρωτόκολλο).....179

8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ (h-TERT).....	181
8.1 Εισαγωγή.....	181
8.2 Μέθοδοι.....	182
8.2.1 Κυτταρικές σειρές, αντιδραστήρια και χημικές ουσίες.....	182

8.2.2	Κυτταροκαλλιέργειες.....	183
8.2.3	[3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay]	183
8.2.4	Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)	184
8.2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο [(Real Time Polymerase Chain Reaction – (RT- PCR)]	184
8.2.6	Ανοσοκυτταροχημεία- Immunocytochemistry (ICC)	186
8.3	Στατιστική Ανάλυση.....	186
8.4	Αποτελέσματα.....	187
8.4.1	Η Οκτρεοτίδη καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου.....	187
8.4.2	Η ινσουλίνη ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου	187
8.4.3	Η σύνδιαστική δράση της ινσουλίνης και οκτρεοτίδης στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κύτταρων παχέος εντέρου και η ανασταλτική δράση της PTP.....	187
8.4.4	Εκφραση της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της.....	189
8.4.5	Η επίδραση της οκτρεοτίδης στην ενεργότητα της τελομεράσης.....	193
8.5	Συζήτηση.....	195
8.6	Συμπεράσματα.....	201
9.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	203
10.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	205

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

1. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, R Sfakianaki, M Georgiadou, E Kouroumallis. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancers. Canadian Journal of Surgery. Can J Surg. 2014 Jun;57(3):199-208
2. **Georgios D. Ayiomamitis**, George Notas, Apostolos Zaravinos, Ioannis Drygiannakis, Maria Georgiadou, Ourania Sfakianaki, Niki Mastrodimou, Kyriaki Thermos, Elias Kouroumalis. Effects of octreotide and insulin on colon cancer cellular proliferation and correlation with hTERT activity. Oncoscience. 2014 Jun;1(6):457-467

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΥΠΟ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ (ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ):

3. **GD Ayiomamitis**, G Notas, O Sfakianaki, Th Vasilakaki, Tsavari A, Zaravinos A., IA Mouzas, G Kolios, E Kouroumalis. Tissue PGE2 protein synthesis and immunohistochemistry COX-2 expression on colorectal cancer and adjacent normal tissues. Correlation with clinicopathological parameters and hTERT.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

1. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Δ Νότας, Α Ζαραβίνος, Ο Σφακιανάκη, Μ Γεωργιάδου, Η Κουρούμαλλης. Η εκφραση του p53 και όχι η δραστηριότητα της τελομερασης σχετίζεται με την επιβίωση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, 6-8 Οκτ. 2011, Θεσσαλονίκη
2. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, M Georgiadou, E Kouroumalis. "Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer". Gut 2011;60:A71
doi:10.1136/gut.2011.239301.144
3. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, M Georgiadou, E Kouroumallis. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. British Society of Gastroenterology Annual Meeting. 14–17 March 2011, Birmingham, UK.
4. **Γεώργιος Δ Αγιομαμίτης**, Γεώργιος Νότας, Απόστολος Ζαραβίνος, Αδαμαντία Ζηζη-Σερμπετζόγλου, Μαρία Γεωργιάδου, Ουρανία Σφακιανάκη, Ηλίας Κουρούμαλης. Διαφορές στην ενεργότητα τελομεράσης μεταξύ παχέος εντέρου και ορθού. 29ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 12-15 Νοε. 2014.
5. **Γεώργιος Δ Αγιομαμίτης**, Γεώργιος Νότας, Απόστολος Ζαραβίνος, Ιωάννης Δρυγιαννάκης, Μαρία Γεωργιάδου, Ουρανία Σφακιανάκη, Νίκη Μαστροδήμου, Κυριακή Θερμού, Ηλίας Κουρούμαλης. Η επίδραση της οκτρετίδης και της ινσουλίνης στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου και η σχέση τους με την ενεργότητα της hTERT. 29ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014

ΒΡΑΒΕΥΣΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

1. **Γεώργιος Δ Αγιομαμίτης**, Γεώργιος Νότας, Απόστολος Ζαραβίνος, Αδαμαντία Ζηζη-Σερμπετζόγλου, Μαρία Γεωργιάδου, Ουρανία Σφακιανάκη, Ηλίας Κουρούμαλης. Διαφορές στην ενεργότητα τελομεράσης μεταξύ παχέος εντέρου και ορθού. 29ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ (ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2015)

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: ΓΕΩΡΓΙΟΣ Δ. ΑΓΙΟΜΑΜΙΤΗΣ

Διεύθυνση: Βίκτωρος Ουγκώ 5Α,
Πεντέλη 15236

Τηλέφωνα: 2107719310
6944690607

E-mail: agiomam@med.uoc.gr
agiogeo@gmail.com

Ημερομηνία γέννησης: 19/11/1974

Τόπος γέννησης: Λεμεσός – Κύπρος

Εθνικότητα: Ελληνική

Υπηκοότητα: Κυπριακή

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος με 2 παιδιά

Στρατολογική κατάσταση: Υπηρεσία στην Κυπριακή Εθνοφρουρά (1992-1994)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1. Γενική:

Δίπλωμα GCE A' level in Pure Mathematics, June 1991

Δίπλωμα GCE A' Level in Physics, June 1992

2. Δευτεροβάθμια εκπαίδευση:

Απόφοιτος του «Λανιτείου Λυκείου Α'» στη Λεμεσό, το 1992, συνδυασμός Σ2α (Θετική κατεύθυνση).

3. Πανεπιστημιακή εκπαίδευση:

Πτυχίο Ιατρικής (MD), Βαθμός: «**Λίαν Καλώς**», (Σεπτ.1994 – Ιουλ.2000)

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Ιατρική Σχολή

4. Ξένες Γλώσσες:

Αγγλικά: GCE O' Level in English Language, June 1992

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1. Πλήρης Ειδικότητα σε θέση ειδικευόμενου “Γενικού Χειρουργού”: (Νοέ.2000 – Ιαν.2007),

«Τζάνειο» Γενικό Νοσοκομείο, Β' Χειρουργικό Τμήμα, Πειραιάς, Ελλάς

(Διεύθ. Θεόδωρος Βλάσσης).

Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας «ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ» (CCST), Πρωτ. (4444/13-03-2007)

- 2. Εκπαιδευτική άδεια εξωτερικού (Λαπαροσκοπική Χειρουργική):** (Φεβ.06 – Μάιος 06).
Χειρουργικό Τμήμα Ήπατος Χοληφόρων & Παγκρέατος, Manchester Royal Infirmary, Manchester, UK (Prof. B Ammori)
- 3. Clinical Fellow (Λαπαροσκοπική και Βαριατρική Χειρουργική):** (Οκτ.07 – Αυγ.08)
Χειρουργικό Τμήμα Ήπατος Χοληφόρων & Παγκρέατος. Manchester Royal Infirmary, Manchester, UK (Prof. B Ammori)
- 4. Visiting Fellow (Λαπαροσκοπική και Βαριατρική Χειρουργική):** (Σεπτ.08 – Δεκ.08)
Northwestern University, Chicago, IL, USA (Prof CT Frantzides) (CIMIS)
- 5. Επικουρικός Χειρουργός (Επιμελητής Β'): (Δεκ.2008 – Ιαν.2011)**
«Τζάνειο» Γενικό Νοσοκομείο, Β' Χειρουργικό Τμήμα,
Πειραιάς, Ελλάς (Διεύθ. Φοίβος Γεωργιάδης)
- 6. Χειρουργός (Επιμελητής Β'): (Ιαν.2011 – σήμερα)**
«Τζάνειο» Γενικό Νοσοκομείο, Β' Χειρουργικό Τμήμα,
Πειραιάς, Ελλάς (Διεύθ. Φοίβος Γεωργιάδης)

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ

- 1. Ως ειδικευόμενος Χειρουργικής**
 - Χειρουργός : 709
 - 1ος Βοηθός : 600
 - Σύνολο Χειρουργικών επεμβάσεων : 1309
- 2. Ως ειδικευμένος Χειρουργός Επιμελητής**
 - Επείγοντα Περιστατικά : 272
 - Τακτικά Περιστατικά : 1243
 - Σύνολο Χειρουργικών Επεμβάσεων : 1515

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

- 1. Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής (Ph.D.):** (Μάρ.2003 – σήμερα)
«Μελέτη της τελομεράσης και κυκλοξυγενάσης-II στις κακοήθειες του παχέος εντέρου».
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης, Τμήμα Γαστρεντερολογίας, Ιατρική Σχολή
(Καθ. Ηλίας Κουρούμαλης)
- 2. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα (M.Sc.):** Βαθμός: Άριστα: 9.16/10 (Ιαν.2010 – Δεκ.2011) –
«Ελάχιστα Επεμβατικής Χειρουργικής, Ρομποτικής Χειρουργικής & Τηλεχειρουργικής»
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Πειραματικό Χειρουργείο
(Καθ. Χρήστος Τσιγκρής)

3. Δημοσιεύσεις άρθρων

α) Ελληνικές δημοσιεύσεις

1. CT Frantzides, AK Madan, MA Carlson, TM Zeni, M Luu, JG Zografakis, M Meiselman, J Roberts, **GD Ayiomamitis**. "Laparoscopic colorectal surgery in an academic US center". Hellenic journal of Surgery 2009 Jul-Aug;81(4):80-86
2. Σ. Κουρουμπάς, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Π Σταθάκης, Μ Ιακωμίδης, Φ Κυραμαργιός, Σ Κοντοστόλης, Φ Γεωργιάδης. Μαζική Ενδοκοιλιακή Αιμορραγία Συνέπεια Ρήξης Σιγμοειδικών Αγγείων μετά από Αμβλύ Κοιλιακό Τραυματισμό. Επιστημονικά Χρονικά 2009;14(4):206-207
3. Π. Σταθάκης, Α. Οικονομοπούλου, Χ. Λιάκος, Θ. Τσαβολάκης, **ΓΔ. Αγιομαμίτης**, Σ. Κοντοστόλης, Φ. Γεωργιάδης. "Τροφοπιλήματα λεπτού εντέρου. Μια ασυνήθιστη αιτία εντερικής απόφραξης". Επιστημονικά Χρονικά 2009;14(1):27-28
4. Σ Ρίζος, **ΓΔ Αγιομαμίτης**. Ο ρόλος της ελάχιστα επεμβατικής Χειρουργικής στο Γαστρεντερικό. Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία 2009 Oct-Dec;(46):8-12
5. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Α Αβρααμίδου, Ε Κουρουμπάς, Φ Κυραμαργιός, Θ Τσαβολάκης, Φ Γεωργιάδης. Λαπαροσκοπική αντιμετώπιση επιπλακείσας τραυματικής ρήξης διαφράγματος με πρωτογενή συρραφή και πλήρη εξάλειψη πνευμοθώρακα. Επιστημονικά Χρονικά 2012;17(2):105-11
6. Π Σταθάκης, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Χ. Τσιγκρής, Λαπαροσκοπική προσέγγιση στην αντιμετώπιση των στρωματικών όγκων πεπτικού (GIST). Ανασκόπηση βιβλιογραφίας. Review of the Literature. Hellenic Journal of Surgery [Accepted for Publication **260-26/3/2012**].
7. Ν. Κανέλλιας, Δ. Κατσουράκης, Α. Αγκελίδη, Γ. Κρανιδιώτης, **ΓΔ. Αγιομαμίτης**, Δ. Μυστέρη, Κ Μανωλουδάκη, Α. Μελιδώνης. Μονόπλευρη μασχαλιαία λεμφαδενοπάθεια, σαν μοναδικό εύρημα της νόσου του Castleman. Επιστημονικά Χρονικά 2013;18(4):252-260

β) Ξένες δημοσιεύσεις

8. **GD Ayiomamitis**, B Alkari, A Owera, BJ Ammori. "Emergency Laparoscopic Splenectomy for splenic trauma on a Jehovah Witness' Patient. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2008 Dec;18(6):626-30.
9. **GD Ayiomamitis**, J Low, B Alkari, BJ Ammori. "Role of Laparoscopic right portal vein ligation in planning staged or major liver resection". J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2009 Jun;19(3):409-13.
10. CT Frantzides, AK Madan, MA Carlson, TM Zeni, JG Zografakis, RM Moore, M Meiselman, M Luu, **GD Ayiomamitis**. "Laparoscopic Revision of Failed Fundoplication and Hiatal Herniorrhaphy". J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2009 Apr;19(2):135-9
11. CT Frantzides, MA Carlson, VK Shostrom, J Roberts, G Stavropoulos, **GD Ayiomamitis**, A Frantzides. "A Survey of Dumping Symptomatology after Gastric Bypass with or Without Lesser Omental Transection". Obes Surg 2010. Apr 9 [Epub ahead of print]

12. C Quah, **GD Ayiomamitis**, A Shah, BJ Ammori. "Computed Tomography to detect accessory spleens prior to Laparoscopic Splenectomy". *Surg Endosc.* 2011 Jan;25(1):261-5.
13. K Stamatiou, **GD Ayiomamitis**, A Zizi-Sermpetzoglou, A Skolarikos. "Primary adenocarcinoma of the seminal vesicles. A phantom tumor". *Tumori* 2010 [Accepted for publication]
14. JK Low, **GD Ayiomamitis**, A Hamoudi, BJ Ammori. "Spontaneous rupture of the splenic capsule with massive bleeding subsequent to Pringle's manoeuvre during Laparoscopic Liver resection". *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2011 Apr;21(2):e84-6.
15. BJ Ammori, **GD Ayiomamitis**. "Laparoscopic pancreatoduodenectomy & distal pancreatectomy, series from a UK, centre & systematic review". *Surg Endosc.* 2011 Jul;25(7):2084-99.
16. **GD Ayiomamitis**, PCh Stathakis, E Kouroumpas, A Avraamidou, Georgiades. "Laparoscopic repair of congenital diaphragmatic hernia complicated with sliding hiatal hernia with reflux in adult". *Int J Surg Case Rep.* 2012; 3(12): 597-600
17. **GD Ayiomamitis**, A Zaravinos, PCh Stathakis, E Kouroumpas, Ph Georgiades, G Polymeneas. "Tacks-free transabdominal preperitoneal (TAPP) inguinal hernioplasty, using an anatomical three-dimensional lightweight mesh with peritoneal suturing. Pain and recurrence outcomes. Initial experience. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2013 Aug;23(4):e150-5.
18. **GD Ayiomamitis**, A Avraamidou, Th Tsavolakis, E Kouroumbas, CT Frantzides. "Huge chronic trauma-rupture of the left diaphragm complicated with massive visceral herniation and colon obstruction. Laparoscopic primary suture repair, sparing chest tube". *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques Part B – Videoscopy.* 2013; January (Ahead of print)
19. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, R Sfakianaki, M Georgiadou, E Kouroumallis. "Diferences in telomerase activity between colon and rectal cancers". *Canadian Journal of Surgery. Can J Surg.* 2014;57(3):199-208.
([PhD supporting article](#))
20. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, I Drygiannakis, M Georgiadou, O Sfakianaki, N Mastrodimou, K Thermos, E Kouroumalis. Effects of octreotide and insulin on colon cancer cellular proliferation and correlation with hTERT activity. *Oncoscience.* 2014 Jun;1(6):457-467
([PhD supporting article](#))
21. D Myoteri, D Dellaportas, **GD Ayiomamitis**, K Strigklis, E Kouroumpas, A Zizi-Sermpetzoglou. Primary angiosarcoma of the spleen: An oncological Enigma. *Case Reports in Oncological Medicine.* Volume 2014, Article ID 193036, 4 pages
22. Staikou C, A Avraamidou, **GD Ayiomamitis**, S Vrakas, E Argyra. Comparison between lumbar epidural analgesia and intravenous infusion with lidocaine, on postoperative pain and bowel motility, in patients undergoing open major abdominal colonic surgery. *G Gastrointest Surg.* 2014 Sept 23 [Epub ahead of print]

a) Δημοσιεύσεις στα Συμπληρώματα έγκριτων Περιοδικών

23. **GD Ayiomamitis**, RS Date, JK Low, BJ Ammori. "The laparoscopic approach to distal pancreatectomy. Results and outcomes of a single UK HPB centre". Journal of IHPB association. 2009 June; 11(Suppl.2): 78
24. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. "Laparoscopic Roux-en-Y Hepaticojejunostomy. The operative technique". Journal of IHPB association. 2009 June; 11(Suppl.2): 136
25. **GD Ayiomamitis**, JK Low, A Hamoudi, BJ Ammori. "Laparoscopic posterior liver segmentomy. The way forward". Journal of IHPB association. 2009 June; 11(Suppl.2): 102-103
26. **GD Ayiomamitis**, B Alkari, A Hamoudi, BJ Ammori. "Laparoscopic pancreatoduodenectomy. Is it worthwhile?" Journal of IHPB association. 2009 June; 11(Suppl.2): 115
27. **GD Ayiomamitis**, NC Henley, BJ Ammori. "Laparoscopic approaches to pancreatic pseudocysts". Journal of IHPB association. 2009 June; 11 (Suppl.2): 165
28. **GD Ayiomamitis**, H Abbas, BJ Ammori. "Bilateral thoracoscopic splachnotomy for the intractable pancreatic pain". Journal of IHPB association. 2009 June; 11 (Suppl.2): 42
29. **Ayiomamitis GD**, Kausar A, Hamoudi A, O'Reilly D, Sherlock D, Ammori B. "Laparoscopic pancreaticoduodenectomy and distal pancreatectomy: experience with 24 resections". Journal of IHPB association. 2009 Apr; 12 (Suppl.): 203
30. **Ayiomamitis GD**, Kausar A , Hamoudi A , Desphande R , Manu M , O'Reilly D , Sherlock D , Ammori BJ. "Laparoscopic liver resection: experience from the first 40 consecutive cases". Journal of IHPB association. 2009 Apr;12(Suppl.):194-5
31. **Ayiomamitis GD**, Notas G, Zaravinos A, Sfakianaki O, Georgiadou M, Kouroumalis E. "Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer". Eur J Clin Invest. 2011 Apr. Vol. 41. Pages 13-14. Suppl. 1.
32. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, M Georgiadou, E Kouroumalis. "Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer". Gut 2011;60:A7

b) Υπό Δημοσίευση:

33. Polymeneas G, Lykoudis P, Nastos C, Vezakis A, **Ayiomamitis GD**, Papaconstantinou I, Argyra E, Theodosopoulos T. "Laparoscopic cholecystectomy in patients with ventriculoperitoneal shunts. Questions and answers
34. **GD Ayiomamitis**, G Notas, O Sfakianaki, Th Vasilakaki, A Tsavari, A Zaravinos, I Mouzas, G Kolios, E Kouroumalis. PGE2 protein expression and COX-2 immunohistochemistry expression on colorectal cancer and adjacent normal tissues. Corellation with clinicopathological parameters, telomerase activity and survival. (PhD supporting article)

4. Ανακοινώσεις, Παρουσιάσεις

α) Ελληνικά Συνέδρια

1. Δ. Ανέστη, Π Μελκή, Ε Καρατζά, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Μ Τσιχλάκης, Ε Παραρά, Σ Κοντοστόλης, Θ Βλάσσης. Η σχέση ηλικίας και αιτίου εισαγωγής στα ΤΕΠ χειρουργικά, ασθενών μετά από τροχαία ατυχήματα. 13ο Πανελλαδικό Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, 18-22 Απρ.2001, Ρόδος.
2. Π Μελκή, Δ Ανέστη, Μ Τσιχλάκης, Ε Καρατζά, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Ε Παραρά, Θ Βλάσσης. Τρόποι αντιμετώπισης επειγόντων Χειρουργικών περιστατικών που εισάγονται στην εφημερία. 13ο Πανελλαδικό Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, 18-22 Απρ.2001, Ρόδος.
3. Π. Σφηκάκης, Π Κόνιαρης, Λ Σοφράς, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Ε Καρατζά, Θ Βλάσσης. Σχέση μεταξύ τοιχωματικής διήθησης του καρκίνου στομάχου και μετάστασης στους λεμφαδένες. 23ο Πανελλαδικό Συνέδριο Χειρουργικής, 9-12 Νοεμβρίου 2002, Αθήνα.
4. Σ Κοντοστόλης, Π Σφηκάκης, Α Λαρεντζάκη, Ε Οικονομίδου, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Θ Βλάσσης. Εμπειρία 17 ετών, στην αντιμετώπιση της οξείας εντερικής απόφραξης από νεοπλάσματα του αριστερού κόλου, με υφολική κολεκτομή και ειλεο-ορθοσιγμοειδική αναστόμωση. 23ο Πανελλαδικό Συνέδριο Χειρουργικής, 9-12 Νοεμβρίου 2002, Αθήνα.
5. Σ Θεοτοκάτου, Ν Κούμαλλος, Ν Φαρμάκης, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Ι Παπαθεοφάνης. Σύγχρονα σωληνώδη αδενώματα παχέος εντέρου και βλεννώδους κυσταδενώματος της σκωληκοειδούς απόφυσης». Ποια η συσχέτισή τους και η κλινική τους σημασία. 10th Πανελλαδικό Συνέδριο Ογκολογίας, 27-30 Νοεμβρίου 2003, Αθήνα.
6. Π Σφηκάκης, Λ Σοφράς, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Σ Κοντοστόλης, Θ Βλάσσης. Τρόποι ελαχιστοποίησης μετεγχειρητικού πόνου μετά από Λαπαροσκοπικές επεμβάσεις. 8ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο Ήπατος-Χολής.-Παγκρέατος, 20-21 Μάϊου 2004, Αλεξανδρούπολη.
7. **GD Ayiomamitis**, Bassam Alkari, Anas Owera, Basil J Ammori. Επείγουσα Λαπαροσκοπική σπληνεκτομή μετά από τραύμα Σπληνός, σε ένα μάρτυρα του Ιεχωβά. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρ. Φόρουμ, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.
8. **GD Ayiomamitis**, Jee K Low, Mohammed Sami, Basil J Ammori. Λαπαροσκοπική περιφερική παγκρεατεκτομή με διατήρηση του σπλήνα για παγκρετικό όγκο. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρ. Φόρουμ, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.
9. **GD Ayiomamitis**, Jee K Low, Basil J Ammori. Άμφω Θωρακοσκοπική σπλαχνοτομή για επίμονο παγκρεατικό πόνο. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρ. Φόρουμ, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.
10. Sfikakis P, **GD Ayiomamitis**, Sofras L, Trogadas G, Kontostolis S, Georgiades PS. Σύγχρονος καρκίνος παχέος εντέρου. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρ. Φόρουμ, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.
11. **GD Ayiomamitis**, Sfikakis PG, Kalkandes CP, Grammatopoulos A, Georgiades PS. Χρήση βίντεο κάψουλας σε καρκίνο λεπτού εντέρου. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρ. Φόρουμ, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.

12. **GD Ayiomamitis**, C Quah, S Asim, BJ Ammori. Is CT scan for detecting accessory spleens prior to laparoscopic splenectomy necessary? 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
13. **GD Ayiomamitis**, JK Low, A Hamoudi, SH Lee, BJ Ammori. What are the indications for laparoscopic right portal vein ligation prior to major hepatectomy? 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
14. **GD Ayiomamitis**, C Quah, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic elective splenectomy to all comers, results of 58 patients. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
15. **GD Ayiomamitis**, B Alkari, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic liver resection – experience of 31 cases. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
16. **GD Ayiomamitis**, RS Ravi, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy and distal pancreatectomy, series from a UK HPB centre. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
17. N Hamza, **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Laparoscopic pancreatic pseudocyst drainage for ‘all comers. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
18. **GD Ayiomamitis**, N Hamza, RS Date, BJ Ammori. Laparoscopic roux-en-y gastric by-pass, a totally handsewn technique and review of the literature. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
19. **GD Ayiomamitis**, S Asim, C Quah, RS Date, BJ Ammori. One stage laparoscopic management for common bile duct stone disease. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens
20. **GD Ayiomamitis**, A Darwish, A Hamoudi, F Fraquharison*, BJ Ammori. Role of portal vein embolization prior to repeat left liver resection sparing segments 1 and 4 for tumor recurrence after right hemihepatectomy for colorectal cancer liver metastasis: a case report and review of the literature. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
21. JK Low, **GD Ayiomamitis**, A Hamoudi, BJ Ammori. Spontaneous rupture of the splenic capsule with massive bleeding subsequent to pringle manoeuvre during laparoscopic liver resection. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens
22. **GD Ayiomamitis**, JK Low, BJ Ammori. Laparoscopic liver resection & portal vein ligation for staged or bilobar liver metastasis. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.

23. **GD Ayiomamitis**, RS Date, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic common bile duct exploration and primary duct closure, for choledocholithiasis. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
24. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Laparoscopic approaches to management of pancreatic pseudocysts. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
25. **GD Ayiomamitis**, RS Date, A Hamoudi, BJ Ammori. Totally laparoscopic Whipple's procedure. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
26. **GD Ayiomamitis**, RS Date, A Hamoudi, BJ Ammori. Totally stapler-less anastomoses in laparoscopic roux-en-y gastric bypass for obesity. 26th Panhellenic Surgical Congress / International Surgical Forum 12-15 November 2008, Athens.
27. J Roberts, CT Frantzides, **GD Ayiomamitis**, AK Madan, MA Carlson, TM Zeni, M Luu, JG Zografakis. Laparoscopic colectomy. Retrospective analysis from an Academic USA centre. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium 21-23 May 2009, Athens.
28. J Roberts, CT Frantzides, **GD Ayiomamitis**. Laparoscopic enterectomy for small intestinal tumors. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium 21-23 May 2009, Athens.
29. **GD Ayiomamitis**, CT Frantzides, J Roberts. Laroscopic ileocecectomy for crohns disease with mesenteric abscess. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium 21-23 May 2009, Athens.
30. **GD Ayiomamitis**, CT Frantzides, J Roberts, J Atkinson, R Gore. Laparoscopic management of spindle cell pseudotumor of the spleen. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium 21-23 May 2009, Athens.
31. **GD Ayiomamitis**, CT Frantzides, J Roberts, MA Carlson. Laparoscopic heller myotomy with complete (360o) fundoplication. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium 21-23 May 2009, Athens.
32. **GD Ayiomamitis**, CT Frantzides, AT Madan, MA Carlson, TM Zeni, JG Zografakis, RM Moore, M Luu. Laparoscopic revision of failed fundoplication and hiatal herniorrhaphy. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium 21-23 May 2009, Athens.
33. CT Frantzides, **GD Ayiomamitis**, J Roberts. Laparoscopic transgastric esophageal mucosal resection for high grade dysplasia; a follow-up series, with 7 year results. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium 21-23 May 2009, Athens.

34. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Laparoscopic Roux-en –Y gastric bypass for morbid obesity. Stapler free technique. 6th Panhellenic Congress for Obesity Surgery 12-13 June 2009, Athens.
35. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Rare occasion of remnant stomach necrosis after a Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. 6th Panhellenic Congress for Obesity Surgery 12-13 June 2009, Athens.
36. CT Frantzides, A Madan, **GD Ayiomamitis**, J Glover. Λαπαροσκοπική γαστρική παράκαμψη σε 1,692 ασθενείς με νοσογόνο παχυσαρκία, εφαρμόζοντας το triple stapling technique. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 30η Οκτ.-1η Νοε. 2009 Λευκωσία, Κύπρος.
37. Σ. Κουρουμπάς, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Π Σταθάκης, Μ Ιακωμίδης, Φ Κυραμαργιός, Σ Κοντοστόλης, Φ Γεωργιάδης. Μαζική ενδοκοιλιακή αιμορραγία συνέπια ρήξης σιγμοειδικών αγγείων μετά από τραύμα. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 30η Οκτ.-1η Νοε. 2009 Λευκωσία, Κύπρος.
38. CT Frantzides, **GD Ayiomamitis**. Λαπαροσκοπική επανεπέμβαση με γαστρική παράκαμψη μετά από αποτυχημένη προηγούμενη εγχείρηση παχυσαρκίας. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 30η Οκτ.-1η Νοε. 2009 Λευκωσία, Κύπρος.
39. CT Frantzides, **GD Ayiomamitis**. Λαπαροσκοπική αποκατάσταση κήλης παρά την στομία. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 30η Οκτ.-1η Νοε. 2009 Λευκωσία, Κύπρος.
40. CT Frantzides, **GD Ayiomamitis**, JL Rosenberg, BJ Ammori. Λαπαροσκοπική περιφερική παγκρεατεκτομή. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 30η Οκτ.-1η Νοε. 2009 Λευκωσία, Κύπρος.
41. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Λαπαροσκοπική Roux-en-Y γαστρική παράκαμψη για νοσογόνο παχυσαρκία. Παρουσίαση τεχνικής συρραφής της γαστρονησιτιδικής αναστόμωσης χωρίς συρραπτικά. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 30η Οκτ.-1η Νοε. 2009 Λευκωσία, Κύπρος.
42. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Κ Μανωλουδάκη, Θ Βασιλακάκη, Π Σταθάκης, Α Βίτσας, Ν Βλαχάκος, Π Σφηκάκης, Φ Γεωργιάδης. Νόσος εξ' ούχων γαλής σαν πιθανή αίτια ετερόπλευρης μασχαλιαίας λεμφαδενοπάθειας σε γυναίκα 60 χρονών. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 30η Οκτ.-1η Νοε. 2009 Λευκωσία, Κύπρος.
43. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Π Σταθάκης, Γ Φιλίππου, Φ Γεωργιάδης, Σ Ρίζος. Αποκατάσταση βουβωνοκήλης με τεχνική (TAPP) χωρίς χρήση συρραπτικών. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κήλης - 27-29 Νοε. 2009, Αθήνα, Ίδρυμα Ευγενίδου.
44. **GD Ayiomamitis**, F Kyramargios, K Stamatiou, I Rellias, A Vitsas, K Manoloudaki, M Paraskevas. Fecaluria as a Sequel of Asymptomatic Severe Sigmoid Diverticulitis. 27ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρ. Φόρουμ, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα.

45. **GD Ayiomamitis**, E Kouroumpas, PCh Stathakis, Th Tsavolakis, A Sakellariou, P Sfikakis. Peritoneal calculi spillage, subsequent gallbladder perforation during laparoscopic cholecystectomy. Intracorporeal gallbladder suturing; a way to prevent conversion to open. 27ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα.
46. ΠΧ Σταθάκης, **ΓΔ Αγιωμαμίτης**, Σ Καστάνιας, Ν Τριγώνης, Ε Μπουλταδάκης, Α Ζήση, Σ Κοντοστόλης. Σπάνιες περιπτώσεις στρωματικού όγκου γαστρεντερικού. Σύγχρονα δεδομένα και επισκόπηση της βιβλιογραφίας Ποια η θέση της λαπαροσκοπικής χειρουργικής. 27ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα.
47. Σ Καστάνιας, Θ Τσαβολάκης, Α Ξάνθης, Σ Φουρνογεράκης, **ΓΔ Αγιωμαμίτης**, Φ Γεωργιάδης. Νοσογόνος παχυσαρκία ως η νόσος του 21ου αιώνα. Εμπειρία μετά από 1000 περιστατικά. 27ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα.
48. **GD Ayiomamitis**, CT Frantzides, PCh Stathakis, Th Tsavolakis, Ph Georgiades. Petersen's internal hernia, after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. Clinical and radiological evaluation for the accurate diagnosis and tips for a successful laparoscopic treatment. 27ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα.
49. **GD Ayiomamitis**, A Vitsas, E Kouroumpas, F Kyramargios, K Stringlis, N Vlachakos, Ph Georgiades. Staple line reinforcement in laparoscopic sleeve gastrectomy, to prevent leakage. A matter of debate, that still exists. 27ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα.
50. **ΓΔ Αγιωμαμίτης**, ΠΧ Σταθάκης, Α Βίτσας, Θ Τσαβολάκης, Ε Κουρουμπάς, Ε Μπουλταδάκης, Φ Γεωργιάδης. Επανεπέμβαση Παχυσαρκίας Με Λαπαροσκοπική Επιμήκη Γαστρεκτομή Μετά Από Αποτυχή Ανοικτή Κάθετη Γαστροπλαστική. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, 7-8 Μαΐου 2011, Αθήνα
51. **ΓΔ Αγιωμαμίτης**, Χ Αλέπη, ΠΧ Σταθακής, Φ Κυραμαργιός, Κ Στριγκλής, Ε Σπυριδόπουλος, Λ Δαδιώτης, Φ Γεωργιάδης. Παχυσαρκία και β-μεσογειακή αναιμία. Ένας σπάνιος συνδυασμός με σαφείς χειρουργικές ενδείξεις. Παρουσίαση περιστατικού & ανασκόπηση διεθνούς βιβλιογραφίας. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, 7-8 Μαΐου 2011, Αθήνα
52. **ΓΔ Αγιωμαμίτης**, Ε Κουρουμπάς, Κ Στριγκλής, Ι Ρέλλιας, Φ Γεωργιάδης. Διάτρηση εντέρου σε λαπαροσκοπική αποκατάσταση μετεγχειρητικής κήλης. Χειρουργικό δίλλημα ή μονόδρομος στον τρόπο αντιμετώπισης. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής, 26-28 Μαΐου 2011, Αθήνα
53. **ΓΔ Αγιωμαμίτης**, ΠΧ Σταθάκης, Α Βίτσας, Φ Κυραμαργιός, Φ Γεωργιάδης. Λαπαροσκοπική επιμήκης γαστρεκτομή για νοσογόνο παχυσαρκία. Ενταφιασμός γραμμής συρραφής. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής, 26-28 Μαΐου 2011, Αθήνα.

54. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Θ Τσαβολάκης, Ε Μπουλαδάκης, Ε Σπυριδόπουλος, Φ Γεωργιάδης. Αποκατάσταση Βουβωνοκήλης Με Τεχνική (TAPP) Με Συρραφή Περιτοναίου Χωρίς Χρήση Συρραπτικών. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής, 26-28 Μαΐου 2011, Αθήνα.
55. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Δ Νότας, Α Ζαραβίνος, Ο Σφακιανάκης, Μ Γεωργιάδου, Η Κουρούμαλης. Η έκφραση του p53 και όχι η δραστηριότητα της τελομεράσης σχετίζεται με την επιβίωση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, 6-8 Οκτωβρίου 2011, Θεσσαλονίκη
56. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Θ Τσαβολάκης, Α Αβρααμίδου, Ε Κουρουμπάς, Ε Μπουλαδάκης, Φ Γεωργιάδης, ΚΘ Φραντζίδης. Λαπαροσκοπική αποκατάσταση παραμελημένης ευμεγέθους μετα-τραυματικής ρήξης διαφράγματος. Παρουσίαση περιστατικού και τρόπος αντιμετώπισης. 10ο Ελλαδο-Κυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, 19-21 Νοεμβρίου 2011, Λευκωσία, Κύπρος.
57. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, ΠΧ Σταθάκης, Α Βίτσας, Φ Κυραμαργιός, Ε Κουρουμπάς, Κ Στριγκλής, Φ Γεωργιάδης, ΚΘ Φραντζίδης. Λαπαροσκοπική αποκατάσταση συγγενούς διαφραγματοκήλης εκ του τενοντίου κέντρου επιπλακείας με ολισθαίνουσα διαφραγματοκήλης σε ενήλικα ασθενή. 10ο Ελλαδο-Κυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, 19-21 Νοεμβρίου 2011, Λευκωσία, Κύπρος
58. **GD Ayiomamitis**, Φ Κυραμαργιός, Β Κοντοστόλης, Ε Μπόγρης, Ζ Κιολέογλου, Φ Γεωργιάδης. Λαπαροσκοπική αφαίρεση γαστρικού δακτύλιου – Τι πρέπει να γνωρίζει σαν μια νέα επέμβαση για ο Γενικός Χειρουργός? 28ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 21-24 Νοε. 2012, Αθήνα.
59. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Π Σταθάκης, Θ Τσαβολάκης, Α Αβρααμίδου, Ε Κουρουμπάς, Γ Κοροβέσης, ΚΘ Φραντζίδης. Συγγενής διαφραγματοκήλη επιπλακεία με ολισθαίνουσα διαφραγματοκήλη σε ενήλικα ασθενή. Η εμπειρία μας με λαπαροσκοπική αντιμετώπιση. Ανασκοπήση της βιβλιογραφίας. 28ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 21-24 Νοε. 2012, Αθήνα.
(ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΒΙΝΤΕΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ)
60. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Π Σταθάκης, Θ Τσαβολάκης, Ε Κουρουμπάς, Κ Στριγκλής, Β Κοντοστόλης, Φ Γεωργιάδης. Λαπαροσκοπική Επίμηκης Γαστρεκτομή για Νοσογόνο Παχυσαρκία. Η Εμπειρία μας, τα αποτελέσματά και οι επιπλοκές της σειράς μας. 28ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 21-24 Νοε. 2012, Αθήνα.
61. Α Αβρααμίδου, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Α Ζαραβίνος, Σ Βρακάς, Χ Κιολέογλου, Φ Παυλόπουλος Σύγκριση μεταξύ της επισκληριδίου αναλγησίας και ενδοφλέβιας λιδοκαΐνης στον μετεγχειρητικό πόνο και στην κινητικότητα του εντέρου στους ασθενείς μετά κολεκτομή. Διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη. 28ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 21-24 Νοε. 2012, Αθήνα
62. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Φ Κυραμαργιός, Ε Κουρουμπάς, Α Ζαραβίνος, Κ Στριγκλής, Γ Κοροβέσης, Γ Πολυμενάς. Λαπαροσκοπική αποκατάσταση βουβωνοκήλης με την μέθοδο (TAPP). Εξέλιξη της μεθόδου χωρίς καθόλου χρήση tacks για εξάλειψη του μετεγχειρητικού πόνου. 28ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 21-24 Νοε. 2012, Αθήνα

63. Χ Βέρρας, Σ Βρακάς, Φ Κυραμαργιός, Π Σφηκάκης, Α Μελιδώνης, **ΓΔ Αγιομαμίτης**. Μελέτη της σύστασης σώματος μέσω βιοηλεκτρικής εμπέδησης πριν και 6 μήνες μετά το Βαριατρικό Χειρουργείο σε Νοσογόνα Παχύσαρκους ασθενείς. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, 17-18 Μαΐου 2013, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
64. Κ Στριγκλής, Ε Κουρουμπάς, Χ Βέρρας, Σ Βρακάς, Α Μελιδώνης, **ΓΔ Αγιομαμίτης**. Η επίδραση της Λαπαροσκοπικής επιμήκους Γαστρεκτομής στην ηπατική βιοχημεία και στο λιπιδολογικό προφίλ των Νοσογόνα Παχύσαρκων ασθενών. Αρχικά αποτελέσματα του κέντρου μας. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, 17-18 Μαΐου 2013, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
65. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Β Κοντοστόλης, Π Χαρατσάρης, Ν Βλαχάκος, Μ Παρασκευάς, Φ Γεωργιάδης. Μείωση συνολικού κόστους Λαπαροσκοπικής Γαστρικής Παράκαμψης για Νοσογόνο Παχυσαρκία. Η τεχνική μας. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, 17-18 Μαΐου 2013, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
66. Γράλιστα Παναγιώτα, Κυραμαργιός Φώτιος, Κιολέογλου Ζαχαρούλα, Ρουπακάς Ευάγγελος, Κοντοστόλης Στυλιανός, **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**. Καθυστερημένη αντιμετώπιση γαστρικής διάτρησης επιπλεγμένης με ισχαιμική νέκρωση λεπτού εντέρου και σιγμοειδούς κόλου. Παρουσίαση περιστατικού. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα
67. Κυραμαργιός Φώτιος, Κοροβέσης Ν. Γεώργιος, Μπόγρης Εμμανουήλ, Κουρουμπάς Ευστράτιος, Φουρνογεράκης Σπυρίδων, **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**. Επείγουσα αντιμετώπιση παραμελημένης οπισθοπεριτονιακή ρήξης τυφλού σε καρκίνο εγκάρσιου. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα
68. Κουρουμπάς Κ Ευστράτιος, Ρουπακάς Η Ευάγγελος, Κυραμαργιός Φώτιος, Μπόγρης Εμμανουήλ, Κιολέογλου Ζαχαρούλα, **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**, Γεωργιάδης Φοίβος. Σπάνια περίπτωση στρωματικού όγκου στο όρθο. Τρόπος αντιμετώπισης και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα
69. Χαρατσάρης Παναγιώτης, Κυραμαργιός Φώτιος, Κοντοστόλης Βασίλειος, Γράλιστα Παναγιώτα, Αργυρίου Ιάσωνας, **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**, Γεωργιάδης Φοίβος. Μη ανατασόμενη βουβωνοκήλη με σάκο να αποκαλύπτει καρκίνο σιγμοειδούς. Τρόπος αντιμετώπισης και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα.
70. Κυραμαργιός Φώτιος, **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**, Κουρουμπάς Ευστράτιος, Στριγκλής Κωνσταντίνος, Γκριλιάτσος Ιωάννης, Τσιγκρής Χρήστος, Διαμαντής Θεόδωρος. Λαπαροσκοπική αποκατάσταση διαφραγματοκήλης με ταυτοχρονή επιμήκη γαστρεκτομή για αντιμετώπιση νοσογόνου παχυσαρκίας επιπλακείας με παλινδρομική νοσο. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα

71. **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**, Κουρουμπάς Ευστράτιος, Κοντοστόλης Βασίλειος, Κυραμαργιός Φώτιος, Χαρατσάρης Παναγιώτης, Παρασκευάς Μάριος. Η θέση της λαπαροσκοπικής κοιλιοπερινεϊκής για καρκίνο όρθου στην έναρξη της εμπειρίας στις λαπαροσκοπικές κολπεκτομές. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα.
72. Κοντοστόλης Βασίλειος, Κουρουμπάς Ευστράτιος, Στριγκλής Κωνσταντίνος, Αργυρίου Ιάσωνας, Σφηκάκης Πέτρος, **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**. Λαπαροσκοπική χολοκυστεκτομή σε ασθενή με πλήρη αναστροφή σπλάχνων. Τρόπος αντιμετώπισης και κίνδυνοι. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα
73. **Αγιομαμίτης Δ Γεώργιος**, Μπισταράκης Δημήτριος, Κουρουμπάς Κ Ευστράτιος, Κυραμαργιός Φώτιος, Κοροβέσης Γεώργιος, Βλαχάκος Νικόλαος. Λαπαροσκοπική αντιμετώπιση χρόνιας ευμεγέθους διαφραγματοκήλης (τύπου iv) επιπλακείας με συστροφή στομάχου. Παρουσίαση της τεχνικής μας. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα
74. **Γεώργιος Δ Αγιομαμίτης**, Γεώργιος Νότας, Απόστολος Ζαραβίνος, Αδαμαντία Ζηζη-Σερμπετζόγλου, Μαρία Γεωργιάδου, Ουρανία Σφακιανάκη, Ηλίας Κουρούμαλης. Διαφορές στην ενεργότητα τελομεράσης μεταξύ παχέος εντέρου και ορθού. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα. (ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ) (PhD Supporting Article)
75. **Γεώργιος Δ Αγιομαμίτης**, Γεώργιος Νότας, Απόστολος Ζαραβίνος, Ιωάννης Δρυγιαννάκης, Μαρία Γεωργιάδου, Ουρανία Σφακιανάκη, Νίκη Μαστροδήμου, Κυριακή Θερμού, Ηλίας Κουρούμαλης. Η επίδραση της οκτρετίδης και της ινσουλίνης στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου και η συσχέτιση τους με την ενεργότητα της hTERT. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα. (PhD Supporting Article)
- β) Διεθνή συνέδρια**
76. P.Manousou, V.Valatas, M.Tambakakis, G.Notas, C.Xidakis, **GD Ayiomamitis**, G.Kolios, E.Kouroumalis. Differential effect of ciprofloxacin on cytokine induced chemokine production in a human colonic epithelial cell line, HT-29. 12th United European Gastroenterology Week - 15-29 Sep 2004, Prague, Tsechoslovakia Republic
77. **GD Ayiomamitis**, Basil J Ammori. Laparoscopic Liver Resection". Case report - Review of the literature. Northwest HPB meeting, MRI Hospital - 10 April 2008, Manchester, UK
78. **GD Ayiomamitis**, JK Low, B Alkari, SH Lee, BJ Ammori. Role of Laparoscopic portal vein ligation in planning staged or major liver resection. ASGBI 2008 International Surgical Congress - 12-16 May 2008, Bournemouth International Centre, U.K.
79. A Shah, C Quah, **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Primary duct closure following laparoscopic BDE for choledocholithiasis. ASGBI 2008 International Surgical Congress - 12-16 May 2008, Bournemouth International Centre, U.K.

80. **GD Ayiomamitis**, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic Liver resection. 2nd International Live Laparoscopic Surgery Meeting 27-29 May 2008, Dundee, U.K.
81. **GD Ayiomamitis**, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic handsuture Roux en Y Gastric by-pass for obesity. 2nd International Live Laparoscopic Surgery Meeting 27-29 May 2008, Dundee, U.K.
82. A Shah, **GD Ayiomamitis**, C Quah, BJ Ammori. Primary duct closure following laparoscopic bile duct exploration for choledocholithiasis. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
83. B Alkari, **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Laparoscopic liver resection - UK experience. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
84. **GD Ayiomamitis**, JK Low, B Alkari, SH Lee, BJ Ammori. The role of Laparoscopic portal vein ligation prior to major liver resection. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
85. C Quah, **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori, A Shah. Computed tomography to detect accessory spleens prior to laparoscopic splenectomy. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
86. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Laparoscopic pseudocyst-gastrostomy: transgastric and lesser sac approaches. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
87. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Laparoscopic hand sewn gastro-jejunostomy in gastric by-pass procedure for morbid obesity. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden.
88. JK Low, **GD Ayiomamitis**, C Quah, BJ Ammori. Bilateral thoracoscopic splanchnotomy for intractable abdominal pain of pancreatic origin. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
89. **GD Ayiomamitis**, JK Low, BJ Ammori. Laparoscopic Liver resection. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
90. JK Low, **GD Ayiomamitis**, JC Bell, BJ Ammori. Laparoscopic right portal vein ligation. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
91. **GD Ayiomamitis**, JK Low, C Quah, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic Massive splenectomy for 5000g spleen. 16th International Congress of the EAES - 11-14 June 2008, Stockholm, Sweden
92. **GD Ayiomamitis**, RS Date, BJ Ammori. Laparoscopic Liver resection. Preliminary results from a UK centre. 13th Annual Roger Croton Surgical Meeting - 19 June 2008, Liverpool, U.K.

93. CT Frantzides, M Luu, J Roberts, **GD Ayiomamitis**, S Loizides, A Papafili, MA Carlson, TM Zeni, JG Zografakis, RM Moore, A Madan. Hiatal Hernia Repair by SAGES Members. 94th Annual Clinical Meeting of the American College of Surgeons 12-16 October 2008, San Fr., USA
94. **GD Ayiomamitis**, RS Date, JK Low, BJ Ammori. The laparoscopic approach to distal pancreatectomy. Results and outcomes of a single centre. 8th Congress of the European HPB Association 18-20 June 2009, Athens, Greece. Journal of IHPB association 2009 June;11(Suppl.2):78
95. **GD Ayiomamitis**, BJ Ammori. Laparoscopic Roux-en-Y Hepaticojejunostomy. The operative technique. 8th Congress of the European HPB Association 18-20 June 2009, Athens, Greece. Journal of IHPB association 2009 June;11(Suppl.2):136
96. **GD Ayiomamitis**, JK Low, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic posterior liver segmentomy. The way forward. 8th Congress of the European HPB Association 18-20 June 2009, Athens, Greece. Journal of IHPB association 2009 June;11(Suppl.2):102-103
97. **GD Ayiomamitis**, B Alkari, A Hamoudi, BJ Ammori. Laparoscopic (Whipple's) pancreatoduodenectomy. Is it worthwhile? 8th Congress of the European HPB Association 18-20 June 2009, Athens, Greece. Journal of IHPB association 2009 June;11(Suppl.2):115
98. **GD Ayiomamitis**, NC Henley, BJ Ammori. Laparoscopic approaches to pancreatic pseudocysts". 8th Congress of the European HPB Association 18-20 June 2009, Athens, Greece. Journal of IHPB association 2009 June;11(Suppl.2):165
99. **GD Ayiomamitis**, H Abbas, BJ Ammori. Bilateral thoracoscopic splanchnotomy for the intractable pancreatic pain". 8th Congress of the European HPB Association 18-20 June 2009, Athens, Greece. Journal of IHPB association 2009 June;11(Suppl.2):42
100. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, O Sfakianaki, M Georgiadou, E Kouroumalis. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer". Eur J Clin Invest 2011;(41):13-14.Suppl.1
101. **GD Ayiomamitis**, A Hamoudi, N Hamza, BJ Ammori. Laroscopic Pancreaticoduodenectomy and distal pancreatectomy. Pancreatic Society Great Britain & Ireland, Annual scientific meeting 2 - 4 Dec. 2009, Leeds, UK
102. **GD Ayiomamitis**, A Hamoudi, BJ Ammori. Necrosis and perforation of the excluded stomach following Roux-en-Y gastric bypass for obesity - How to manage the unexpected. 1st British Obesity & Metabolic Surgery Society (BOMSS) Conference 21-22 Jan 2010, London, UK
103. **GD Ayiomamitis**, A Kausar, A Hamoudi, R Desphande, M Manu, D O'Reilly, D Sherlock, BJ Ammori. Laparoscopic liver resection: experience from the first 40 consecutive cases. 9th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. 18-22 Apr. 2010, Buenos Aires, Argentina. Journal of IHPB association. 2010 Apr;12(Suppl.):194-5

104. **GD Ayiomamitis**, A Kausar, A Hamoudi, D O'Reilly, D Sherlock, BJ Ammori. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy and distal pancreatectomy: experience with 24 resections. 9th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. 18-22 Apr. 2010, Buenos Aires, Argentina. Journal of IHPB association. 2010 Apr;12(Suppl.):203
105. CT Frantzides, A Madan, **GD Ayiomamitis**, Jenifer Glover, John Zografakis. Laparoscopic Gastric By-pass in 1,692 patients. 12th World Congress of Endoscopic Surgery. A World of Technique. 14-17 April 2010 (SAGES)
106. CT Frantzides, BJ Ammori, **GD Ayiomamitis**, JR Glover, SN Welle. "Laparoscopic Distal Pancreatectomy. 19th Annual SLS meeting. 01-04 Sept. 2010, NY, USA.
107. CT Frantzides, **GD Ayiomamitis**, JR Glover, SN Welle. Laparoscopic repair of Parastomal Hernia. 19th Annual SLS meeting. 01-04 Sept. 2010, NY, USA.
108. **GD Ayiomamitis**, G Notas, A Zaravinos, M Georgiadou, E Kouroumalis. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. British Society of Gastroenterology Annual Meeting. 14-17 March 2011, Birmingham, UK.
109. C Verras, Y Simos, **GD Ayiomamitis**, E Foustieris, P Georgiadis, S Konitsiotis, A Evangelou, DN Kiortsis, A Melidonis. "No changes on serum Fetuin-A levels six months after bariatric surgery". Research, Jun 2-5. 19th WONCA Europe 2014. Poster #1375

5. Προσκεκλημένος ομιλητής σε Συνέδρια & Εταιρείες

1. 9th Panhellenic Congress of Laparoscopic Surgery & International Symposium, 21-23 Μαΐου 09, Αθήνα. «Λαπαροσκοπική αντιμετώπιση ψευδοκύστεων παγκρέατος»
2. 9ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, 30η Οκτ. - 1η Νοε. 2009, Λευκωσία, Κύπρος. «Χειρουργική αποκατάσταση ευμεγέθους μετεγχειρητικής κήλης»
3. 27th Panhellenic Surgical Congress & International Surgical Forum, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα. «Tissue regeneration and functional aspects of biologic implants»
4. 27th Panhellenic Surgical Congress & International Surgical Forum, 24-27 Νοε. 2010, Αθήνα. «Challenges of laparoscopic and open mesh fixation. Absorbable or permanent? »
5. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, 7-8 Μαΐου 2011, Αθήνα «Η Μεταβολική Χειρουργική σε εφήβους και νέους. Σημερινά δεδομένα»
6. Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία. Εκπαιδευτικά Σεμινάρια, Αθήνα 2011. «Επιπλοκές ανοικτών & λαπαροσκοπικών επεμβάσεων βουβωνοκήλης. Χρόνιος πόνος.»
7. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής, 26-28 Μαΐου 2011, Αθήνα. «Πολυκεντρικές μελέτες για την λαπαροσκοπική προσπέλαση του ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος: πού βρισκόμαστε σήμερα;»

8. Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία. Εκπαιδευτικά Σεμινάρια, Αθήνα 2012.
“Λαπαροσκοπική διερεύνηση χοληδόχου πόρου.”
9. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, 17-18 Μαΐου 2013, Θεσσαλονίκη
Ποιος πρέπει να είναι ο ρόλος των κέντρων αριστείας στην Ελλάδα
10. 1^ο Πολυθεματικό διεπιστημονικό Συνέδριο, Τζάνειο Γενικό Νοσοκομείο, 28 Νοε.14, Πειραιάς
Βαριατρική Χειρουργική

6. Κλινικά Πρωτόκολλα

- I. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Ε Κουρουμπάς, ΠΧ Σταθάκης, Α Ζαραβίνος, Φ Γεωργιάδης
Εκπονείται από το Β' Χειρουργικό Τμήμα με θέμα: “Λαπαροσκοπική αποκατάσταση βουβωνοκήλης χρησιμοποιώντας τρισδιάστατο πλέγμα αραιής πλέξης χωρίς καθηλωτικά (tacks) και με συρραφή περιτοναίου. Συστηματική μελέτη του χρόνιου πόνου και των υποτροπών της κήλης για χρονικό διάστημα 12 μηνών”. (Ιαν.2009 – Νοε.2011, ολοκλήρωση)
- II. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Α Αβρααμίδου, Φ Παυλόπουλος, Φ Γεωργιάδης
Εκπονείται από το Β' Χειρουργικό Τμήμα σε συνεργασία με το Αναισθησιολογικό Τμήμα με θέμα: “Διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη σύγκρισης οσφυϊκής επισκληριδίου αναλγησίας και ενδοφλέβιας χορήγησης λιδοκαΐνης στον μετεγχειρητικό πόνο, την κινητικότητα του εντέρου και την παραμονή στο νοσοκομείο σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ανοικτή μείζονα χειρουργική επέμβαση του παχέος εντέρου”. (Φεβ.2010-Μαρ.2010, ολοκλήρωση)
- III. **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Κ Στριγκλής, Χ Βέρρας, Κ Μπότσιος, Φ Γεωργιάδης, Α Μελιδώνης
Εκπονείται από το Β' Χειρουργικό Τμήμα σε συνεργασία με το Διαβητολογικό Κέντρο με θέμα: “Συστηματική μελέτη της επίδρασης της Βαριατρικής Χειρουργικής στην ποιότητα ζωής, στην σύνθεση του ανθρωπίνου σώματος, και στις ορμόνες του μεταβολισμού, ασθενών με νοσογόνο παχυσαρκία σε χρονικό διάστημα δυο ετών”. (Φεβ.2009 – σήμερα)
- IV. Κ Στριγκλής, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Α Θεοδόσης, Φ Γεωργιάδης, Σ Φούσσας. Εκπονείται από το Β' Χειρουργικό Τμήμα σε συνεργασία με το Καρδιολογικό Τμήμα του Τζανείου Νοσοκομείου και το Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο: Δυσυγχρονισμός της αριστεράς κοιλίας της καρδιάς σε Νοσογόνα Παχύσαρκους ασθενείς πριν και μετά το Βαριατρικό Χειρουργείο. (Μάιος 2011 – σήμερα)
- V. Ε Κουρουμπάς, **ΓΔ Αγιομαμίτης**, Γ Κοροβέσης, Φ Γεωργιάδης. Εκπονείται από το Β' Χειρουργικό Τμήμα σε συνεργασία με το ακτινολογικό Τμήμα και το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Τζανείου Νοσοκομείου με τίτλο: Μη αλκοολική Στεατο-ηπατίτιδα (NASH) σε Νοσογόνα Παχύσαρκους ασθενείς. Συσχέτιση υπερηχογραφικής εικόνας με ιστοπαθολογικό παρασκεύασμα (από δείγμα ιστού κατά την λαπαροσκόπηση), πριν και 6 μήνες μετά το χειρουργείο (Νοέμβριος 2012 – σήμερα)

7. Κριτής σε Ξένα Ιατρικά Περιοδικά - (Reviewer in peer reviewed Medical Journals)

1. Journal of the Pancreas (JOP)
2. Journal of Medical Case Reports (JMCR)
3. Minerva Chirurgica
4. World Journal of Surgical Oncology (WJSO)

8. Συγγραφικό Έργο

«Video Atlas of Minimally Invasive Surgery 2nd Edition», **Saunders & Elsevier**

Co-author in Book chapters:

1. Bilateral thoracoscopic splachnotomy
2. Laparoscopic handsutured Roux-en-Y Gastric by-pass for obesity
3. Laparoscopic pancreatic pseudocyst management
4. Laparoscopic Whipple's procedure
5. Laparoscopic cholecysto-jejunostomy

9. Βραβεία

- (ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΒΙΝΤΕΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ)

ΓΔ Αγιομαμίτης, Π Σταθάκης, Θ Τσαβολάκης, Α Αβρααμίδου, Ε Κουρουμπάς, Γ Κοροβέσης, ΚΘ Φραντζίδης. Συγγενής διαφραγματοκήλη επιπλακείσα με ολισθαίνουσα διαφραγματοκήλη σε ενήλικα ασθενή. Η εμπειρία μας με λαπαροσκοπική αντιμετώπιση. Ανασκοπήση της βιβλιογραφίας. 28ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 21-24 Νοε. 2012, Αθήνα.

- (ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗΣ) (PhD Supporting Article)

Γεώργιος Δ Αγιομαμίτης, Γεώργιος Νότας, Απόστολος Ζαραβίνος, Αδαμαντία Ζηζη-Σερμπετζόγλου, Μαρία Γεωργιάδου, Ουρανία Σφακιανάκη, Ηλίας Κουρούμαλης. Διαφορές στην ενεργότητα τελομεράσης μεταξύ παχέος εντέρου και ορθού. 29ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο & Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 12-15 Νοε. 2014, Αθήνα.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

A. Εξειδικευμένη Εκπαίδευση Στο Τραύμα:

1. PHTLS (Prehospital Trauma Life Support) of the ACS, Ιουν.2005, Βαθμός 90%
2. ATLS (Advanced Trauma Life Support) of the ACS, Σεπτ.2006, Βαθμός 93%
3. DSTC (Definite Surgical Trauma Care), iatsic®, Ιουν.2009

B. Εξειδικευμένη Εκπαίδευση Στην Επείγουσα Ιατρική:

4. ΕΠΙ (Επείγουσα Προνοσοκομειακή Ιατρική), Οκτ.2004 – Ιούλ.2005, Βαθμός 87.4%
5. ALS (Advanced Life Support) of the ERC, Οκτ.2006, Βαθμός 95%
6. EPLS (European Paediatric Life Support) of the ERC, Ιουν.2007, Βαθμός 95%

C. Εξειδικευμένη Εκπαίδευση Μικροχειρουργική: Φεβ.2009 – Ιούλ.2009

7. Χρήση μικροσκοπίου για αγγειακές αναστομώσεις και αναστομώσεις νεύρων.
Πειραματικό Χειρουργείο Νοσοκομείου «Ευαγγελισμός».

D. Εξειδικευμένη Εκπαίδευση στις ενδοσκοπικές τεχνικές: Μάιος 2010 – Σήμερα

8. Ενδοσκοπική Παλίνδρομος Χολαγγειο-Παγκρεατογραφία (ERCP)
9. Διαδερμική διηπατική χολαγγειογραφία (PTC)
10. Stent οισοφάγου-στομάχου-12δακτύλου
Β' Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αρεταίειο Νοσοκομείο, Ενδοσκοπικό Τμήμα, Αθήνα, Ελλάς (Καθ. Ανδρέας Πολυδώρου)

E. Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια & Μαθήματα

1. **Οργάνωση Επιστημ. δεδομένων (MS Access & Excel)**, Δεκ.2002 (2εβδ.)
Υπουργείο Υγείας, Τζάνειο Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά
2. **Βασική Λαπαροσκοπική Χειρουργική Χοληφόρων**, Μάρ.2003(3ημέρες).
Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. **Ολική Παρεντερική Διατροφή**, Μάιος 2003(1ημέρα).
Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα
4. **Αθλητικές κακώσεις**, Ιούν.2003(100ώρες).
Υπουργείο Υγείας, Τζάνειο Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά.
5. **Συντονιστής Μεταμοσχεύσεων**, Οκτ.2003(100ώρες)
Υπουργείο Υγείας, Τζάνειο Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά, Ελλάδα.
6. **Ορθολογιστική χρήση αντιβιοτικών**, Μάιος 2004(1μήνας).
Αττικόν Νοσοκομείο, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα.
7. **Χειρουργικές Λοιμώξεις**, Φεβ.2005(40ώρες)
Υπουργείο Υγείας, Τζάνειο Γενικό Νοσοκομείο Πειραιάς
8. **Μετεκπαιδευτικά μαθήματα στην Βασική Λαπαροσκοπική Χειρουργική**, Ιούν.2006(2ημ.)
European Association for Endoscopic Surgery, Πανεπιστήμιο Αθηνών
9. **Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια στην Ενδοκρινική Χειρουργική**, Σεπ.2006
IAES (International Association of Endocrine Surgeons), Ηράκλειο, Κρήτη
10. **Higher Surgery Course for the FRCS**, Ιαν.2008 (1εβδ.) Medical Education Centre, Whipps Cross Hospital, University Hospital, London, U.K.
11. **Laparoscopic Hernia Masterclass Course**, Ιουν.2008(1ημέρα)
Queens Medical Centre, Nottingham, U.K.
12. **Εκπαίδευση στη λαπαροσκοπική χειρουργική σε πειραματικά χειρουργεία**.
Ιουν.2009(2ημέρες). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
13. **Εκπαίδευση στη Λαπαροσκοπική χειρουργική του παχέος εντέρου**.
Σεπτ.2010(2ημέρες). «Νοσοκομείο Ερρίκος Ντυνάν» (ELPEN)
14. **Transinguinal Preperitoneal Patch technique (TIPP), in inguinal hernioplasty**.
Μαρ.2011(1ημέρα). Flevo Ziekenhuis, Almere, Netherlands
15. **Cambridge Anastomosis Workshop for Specialist Trainees in Surgery**. Ιούλ.2012
(5ημέρες). Addenbrookes University Hospital, Cambridge, UK
16. **Total Extraperitoneal Prosthesis (TEP) technique for inguinal hernia repair at the Waterland Hospital Purmerend**, Dec.2012 (2days), The Netherlands
17. **Laparoscopic Colorectal Course**, 10-12 Apr. 2013 (Prof Luigi Boni) Minimally Invasive Surgery Research Center, Department of Surgical and Morphological Sciences, University of Insubria – Varese, Italy.

18. **Minimally Invasive Surgery Course, Colorectal Diseases**, 7-8 June 2013 (Prof G Tzovaras) Medical School, University of Thessaly, Larissa.
19. **Surgical Expert Forum in General Surgery including training course in laparoscopic surgery**, 05-06 Dec 2013. (Prof Antonio Lacy, Prof Karl-Hermann Fuchs), Olympus Medical Training Centre, Hamburg, Germany
20. **Open IPOM (Intraperitoneal Onlay Mesh)**, 28Feb 2014. (Prof. Michael Scott), Professional Educational Workshop, Ethicon European Surgical Institute, Hamburg, Germany.
21. **TEM (Transanal Endoscopic Microsurgery) Workshop** in the Richard Wolf Prima Vista Academy, 14th – 17th April 2014 Knittlingen, Germany.
22. **Endoline Roma 2014**. 22-23 May. (Prof Costamagna G), Catholic University Rome Policlinico A. Gemeli, Rome, Italy
23. **Laparoscopic Cadaveric Colorectal Course**, 18 Jun 2014, Addenbrookes University Hospital, Cambridge UK
24. **THD (Transanal Haemorrhoid Dearteriazation) Course**. 8-9 October (Prof Carlo Rato), Catholic University Rome Policlinico A. Gemeli, Rome, Italy

F. Συμμέτοχή σε Συνέδρια

α. Ελληνικά Συνέδρια

1. 24ο Ετήσιο Συνέδριο Ιατρικής, Μάϊος 1994, Αθήνα
2. 19ο Συνέδριο Καρδιολογίας, Οκτ.1998, Αθήνα
3. 25ο Ετήσιο Συνέδριο Ιατρικής, Μάϊος 1999, Αθήνα
4. XXII Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Νοέμ.2000, Αθήνα
5. XXIII Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Νοέμ.2002, Αθήνα
6. 6ο Διεθνές Συμπόσιο στην Λαπαροσκοπική Χειρουργική, Μάϊος 2003, Αθήνα
7. Συνέδριο Τραύματος, Φεβρ.2004, Αθήνα
8. Μετ/δευτικά μαθήματα. Διάγνωση & αντιμετώπιση παθήσεων εντέρου, Δεκ.04, Αθήνα
9. 7ο Διεθνές Συμπόσιο στην Λαπαροσκοπική Χειρουργική, Μάϊος 2005, Ιωάννινα
10. Τεχνολογικές εξελίξεις στην Γενική Χειρουργική, Ιαν.2006, Αθήνα
11. Σεμινάρια Γενικής Χειρουργικής. ΕΧΕ, Μάϊος –Δεκ. 2006, Αθήνα
12. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Χειρ. Φόρουμ, Νοέμ.2006, Αθήνα
13. 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Φόρουμ, Νοεμ.2008, Αθήνα
14. 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής, Μάϊος 2009, Αθήνα
15. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, Ιούν. 2009, Athens
16. 4ον Συνέδριο Κήλης, Νοε.2009, Αθήνα
17. 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Φόρουμ, Νοε.2010, Αθήνα
18. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, Μάϊος 2011, Αθήνα
19. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής, Μάϊος 2011, Αθήνα
20. 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Φόρουμ, Νοε.2010, Αθήνα
21. Κατευθυντήριες οδηγίες για την Χειρουργική του Μαστού, 2012, Αθήνα
22. 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Φόρουμ, Νοε.2012, Αθήνα
23. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής της Παχυσαρκίας, Μάϊος 2013, Θεσσαλονίκη
24. 29ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές Φόρουμ, Νοε.2014, Αθήνα

β. Διεθνή Συνέδρια

24. Inflammatory Bowel Disease from bench to bedside, Ιούν.2003, Ηράκλειο
25. 7ο Ελληνο-Κυπριακό Συνέδριο Χειρουργικής, Οκτ.2005, Λευκωσία, Κύπρος.
26. ASGBI 2006 Annual Scientific Surgical Meeting, Μάϊος 2006, Edinburgh, UK

27. Northwest Hepato Pancreato Biliary (HPB) meeting, Απρ.2008, MRI, Manchester, UK
28. ASGBI 2008 International Surgical Congress, Μάιος 2008, Bournemouth, UK
29. National Hernia Symposium, Ιούν.2008, Cavendish, London, U.K.
30. 16th International Congress of the EAES, Ιούν.2008, Stockholm, Sweden
31. Society of Laparoendoscopic Surgeons 17th Annual Meeting, Σεπτ.2008, Chicac, USA
32. Med Cosmetic Meeting (Syris Scientific), Οκτ. 2008, Chicago (Illinoi), USA
33. American College of Surgeons 94th Annual Clinical Congress, Οκτ.2008, San Fr., USA
34. 8th Congress of the European Hepato-Pancreato-Biliary Association, Ιούν.2009, Αθήνα
35. 95th Annual Clinical Congress of Surgery, Οκτ.2009, Chicago, USA
36. 9ον Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, Οκτ.2009, Λευκωσία, Κύπρος
37. Conference of the British Obesity & Metabolic Surgery Society, Ιαν.2010, London, UK
38. International Experts' Meeting on Advanced Laparoscopic Surgery, Σεπτ.2010, Αθήνα
39. 10ο Ελλαδο-Κυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, Νοε.2011, Λευκωσία, Κύπρος
40. 29th Annual Meeting of the (ASMBS), Ιουν. 2012, San Diego, California, USA

ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΣΥΛΛΟΓΟΥΣ & ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

1. Ιατρικός σύλλογος Πειραιά, Ελλάς (Αρ. 101600), από Νοε.2000
2. Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία, (Δόκιμο μέλος) από Απρ.2004
3. General Medical Council (GMC) (Specialist Registered - 6037449), από Νοε.2005
4. Ιατρικός Σύλλογος Λεμεσού, Κύπρος, από Απρ.2007
5. Επιστημονικό Συμβούλιο Τζανείου Νοσοκομείου, Πειραιά από Οκτ.2011
6. American Society of Metabolic & Bariatric Surgery, αίτηση μέλους τον Ιούν.2012
7. Hellenic Surgical Society for Obesity since Dec.2012
8. International Federation For the Surgery of Obesity (IFSO) since Dec.2012

ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ ΣΤΟ Ε.Σ.Υ.

Χειρουργός Επιμελητής Β': 6 Χρόνια
«Τζάνειο» Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά

ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

1. Windows OS, Macintosh OS
2. MS Office (Word, Excel, Access, PowerPoint),
3. Acrobat Reader Professional,
4. K-Pacs, Photoshop, Corel,
5. EndNote, Reference Manager
6. Video Studio editing, Windows movie maker,
7. Use of Internet

ΣΥΣΤΑΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΟΛΕΣ

- 1. Prof Constantine T Frantzides
MD, PhD, FACS**
Professor of Surgery University of Illinois
Director of advanced laparoscopic &
Bariatric surgery fellowship program,
St Francis Hospital
Director, Chicago Institute of Minimally
Invasive Surgery,
4905 Old Orchard Centre, Suite 409
Skokie, IL 60077
Tel.: +1(847) 676-2200
Fax: +1(847) 676-1813
E-mail: cfrantzides@cimis.info
- 2. Prof Basil J Ammori, MD, FRCS**
Consultant Hepato-Pancreato-Biliary
& Laparoscopic Surgeon
North-Manchester General Hospital
Delaunays Road, Crumpsall,
Manchester, M8 5RB, UK
Tel.: +44 161 7202226
E-mail : BAmmori@btinternet.com
- 3. Prof George Polymeneas MD, PhD**
Associate Professor of Surgery,
B' Surgical Dept, University of Athens,
University Hospital of Athens,
Vasilissis Sofias Ave 76, Athens 11528
E-mail: gpolym@med.uoa.gr
- 4. Prof Konstantinos Konstantinides
MD, PhD, FACS**
Associate Professor of Surgery,
Ohio State University, USA
Athens Medical Center
4th Building, 8th floor
Distomou 3, Maroussi 151 25
Tel.: 210 6107165, 210 6107189
Fax: 210 6157375
E-mail: info@kkonstantinidis.com
- 5. Prof Elias Kouroumalis MD, PhD**
Professor of Gastrenterology
Head of the Department
University of Crete
Faculty of Medicine
P.O Box 1393, Heraklion,
71409, Crete, Greece
Tel: +302810 392356
Fax: +302810 542085
E-mail: kouroum@med.uoc.gr
- 6. Dr Phivos Georgiades MD,**
Consultant Surgeon
Head of the B' Surgical Department,
Tzanion General Hospital of Piraeus,
Zanni & Afentouli 1, 18536 Piraeus
Tel: +30 210 4592496
Fax: +30 210 4525466

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στην Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης.

Στον διευθυντή της Πανεπιστημιακής Γαστρεντερολογικής Κλινικής, Καθηγητή Κ. Ηλία Κουρούμαλη, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες, για τη στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια και τις χρήσιμες συμβουλές του. Χωρίς τη δική του ενθάρρυνση, η ολοκλήρωση της διατριβής δεν θα ήταν δυνατή.

Τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη και τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω τον Επ. Καθηγητή Κ. Γεώργιο Νότα για την καθοδήγηση του, τις συμβουλές του και ιδιαίτερα για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου του προκειμένου να γίνουν τα πειράματα στο εργαστήριο, να δημοσιευθούν τα αποτελέσματα και να ολοκληρωθεί αυτή η διατριβή.

Στον πολύτιμο μου φίλο και νύν γαμπρό μου Απόστολο Ζαραβίνο, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ολοκληρωτική βοήθεια του σε όλα τα στάδια αυτής της διατριβής από την αρχή μέχρι και το τέλος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις συνεργάτιδες του εργαστηρίου Ουρανία Σφακιανάκη, Μαρία Γεωργιάδου και Ιωάννη Δρυγιαννάκη, για τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσαν για το εργαστηριακό-ερευνητικό μέρος της διατριβής. Το δικό τους ενδιαφέρον και ενθουσιασμός, καθώς και η στήριξη και η καλοσύνη τους, ήταν καθοριστικοί παράγοντες για την ολοκλήρωση του ερευνητικού πρωτοκόλλου, όπως και το ενδιαφέρον όλων των μελών της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου.

Αξίζει να αναφερθεί η πολύτιμη βοήθεια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Τζανείου Νοσοκομείου Πειραιά και ιδιαίτερα του πρώην Διευθ. Κου Ιωάννη Ελεμένογλου και των Διευθυντριών Κων Θήβης Βασιλακάκη και Διαμάντως Ζήζη-Σερμπεντζόγλου για την επιστημονική ιστοπαθολογική επεξεργασία των χειρουργικών δειγμάτων καθώς και την περαιτέρω ανάλυση αυτών.

Ευχαριστώ το Β' Χειρουργικό Τμήμα του Τζανείου Νοσοκομείου και ιδιαίτερα τον Διευθυντή μου Κο Φοίβο Γεωργιάδη, για την απόλυτη ελευθερία που μου έδωσε σε κάθε προσπάθεια μου από την έναρξη της διατριβής αυτής.

Εκ βαθέων ευχαριστώ τη σύζυγο μου Ειρήνη, για την ανεκτίμητη βοήθεια, στήριξη και συμπαράσταση της όλα αυτά τα χρόνια και κυρίως για την κατανόηση, την υπομονή και την ανοχή που έδειχνε για τον απέραντο χρόνο που αφιέρωνα στην Ιατρική και δη στη Χειρουργική και την έρευνα.

Ευχαριστώ την οικογένεια μου που ήταν πάντα δίπλα μου και αγωνιούσε μαζί μου.

Θέλω να ευχαριστήσω τους γιούς μου Δημοσθένη και Νικόλαο για την έμπνευση που μου προσφέρουν από τη στιγμή που ήρθαν στον κόσμο και ας μην το γνωρίζουν.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Χριστό μου και Θεό μου και στην Παναγία Θεοτοκο μου για ΟΛΑ!

Γεώργιος Δ. Αγιομαμίτης

Χειρουργός

ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Εισαγωγή: Ο ορθοκολικός καρκίνος (ΟΚΚ) είναι ένας από τους πιο συχνούς καρκίνους και η τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο και στα δύο φύλα. Η νόσος εξελίσσεται σαν μια διαδικασία πολυσταδιακή και συνοδεύεται από πολλές γενετικές μεταβολές και επιγενετικές τροποποιήσεις. Ανάμεσα σε αυτή τη διαδικασία μεταλλαγών, η ενεργοποίηση της τελομεράσης (hTERT) παίζει καταλυτικό ρόλο στον καταρράκτη της εξέλιξης του όγκου.

Την τελευταία επίσης δεκαετία πολλές μελέτες έχουν συνδέσει την αυξημένη έκφραση της κυκλοξυγενάσης-2 (COX-2) με την παθογένεια πολλών τυπων καρκίνου στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου και του ΟΚΚ. Ενώ οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση αυτή δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, εντούτοις καταδεικνύεται ότι τα κύτταρα του στρώματος του όγκου αλλά και του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού συνεισφέρουν στην ενίσχυση της έκφρασης της COX-2 και κατ' επέκταση στην αύξηση της παραγωγής προσταγλανδίνης-E2 (PGE2) από το αραχιδονικό οξύ.

Η σωματοστατίνη και οι υποδοχείς (sstr) της χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών καθώς διαδραματίζουν ρόλο στην θεραπεία αρκετών νοσημάτων περιλαμβάνοντας και τον ΟΚΚ. Η οκτρεοτίδη είναι ένα συνθετικό πεπτίδιο ανάλογο της σωματοστατίνης που αναστέλλει (in-vitro) την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών καρκίνου παχέος εντέρου. Η ινσουλίνη επίσης σαν τροφικός παράγοντας θέτει σε λειτουργία μιτογόνα σήματα σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων όπως και στον ΟΚΚ.

Μέθοδοι - Σκοπός: Η παρούσα ερευνητική μελέτη αποσκοπεί στην in-vivo εκτίμηση της ενεργότητας της τελομεράσης στους καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου και του ορθού και του αντίστοιχου παρακείμενου φυσιολογικού βλεννογόνου [10εκ. μακριά από τον όγκο]. Σκοπός επίσης είναι η σύγκριση της ενεργότητας της τελομεράσης στους όγκους που εντοπίζονται σε διαφορετικά τμήματα του παχέος εντέρου [δεξιό-αριστερό κόλο και ορθό] και στην ανάλυση της σχέσης μεταξύ της hTERT και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών [φύλο, ηλικία, ΔΜΣ, καπνισμα, βαθμό διαφοροποίησης (grade) του όγκου, στάδιο νόσου

κατά Dukes και TNM], συμπεριλαμβανομένης και της επιβίωσης των ασθενών. Επιπλέον σκοπός είναι να μελετήσουμε την έκφραση του γονιδίου MLH1 ως ένδειξη μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI), την έκφραση του p53 και άλλων βιολογικών δεικτών [Bcl-2, Ki-67] οι οποίοι συσχετίστηκαν με την hTERT. Τέλος, σκοπός είναι η in-vivo μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφραση της COX-2 αλλά και της σύνθεσης της PGE2 στα αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και του ορθού και η συσχέτιση τους με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών αλλά και με την hTERT. In-vitro σκοπός είναι η διερεύνηση της δράσης της οκτρεοτίδης με ή χωρίς την επίδραση του τροφικού παράγοντα (ινσουλίνης), στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών Caco-2 και HT-29 και η σύγκριση της δράση αυτής με την hTERT, καθώς και η μελέτη της συμμετοχής του αναστολέα της πρωτεΐνης των τυροσινικών φωσφατασών (Sodium Orthovanadate - Na₃VO₄) στη ρύθμιση του αντι-πολλαπλασιαστικού δυναμικού της οκτρεοτίδης.

Αποτελέσματα - Συζήτηση: Συμπεριλάβαμε 49 ασθενείς (21 γυναίκες) μέσης ηλικίας 74 ετών (όρια 49-87) με ΟΚΚ επιβεβαιωμένο με βιοψία. Υπήρξε σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα τελομεράσης στους καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ($p=0,006$). Η έκφραση της τελομεράσης ήταν στατιστικά υψηλότερη στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, συγκριτικά με τους καρκίνους που ευρίσκονταν στο ορθό ($p=0,012$). Το ίδιο επαναλήφθηκε και στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ($p=0,035$). Οι καρκίνοι του παχέος εντέρου μαζί με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς εξέφραζαν στατιστικά περισσότερη τελομεράση και ήταν περισσότερο θετικοί στο γονίδιο MLH1 συγκριτικά με τους καρκίνους του ορθού. Η έκφραση του p53, συσχετίστηκε αρνητικά με την ενεργότητα της τελομεράσης αλλά συνδυάστηκε με καλύτερη επιβίωση των ασθενών.

Όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική έκφραση της COX-2, αυτή ήταν θετική σε 40 από τις 49 περιπτώσεις καρκινικού ιστού που εξετάστηκαν (81.6%). Η χρωστική αντίδραση ήταν κυτταροπλασματική, ετερογενής και η ένταση της ήταν από μέτρια έως έντονη. Ασθενέστερη χρώση επίσης ανιχνεύθηκε και στα στρωματικά κύτταρα του όγκου. Παρατηρήθηκε επίσης αντίστοιχη έκφραση COX-2 και στο στρώμα των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Επιβεβαίωση αυτού αποτελεί η πειραματική παρατήρηση περισσότερης σύνθεσης PGE₂ στους φυσιολογικούς ιστούς συγκριτικά με τους αντίστοιχους καρκινικούς ιστούς (p=0.013). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της έντασης και του ποσοστού της έκφρασης της COX-2 με όλες τις ανωτέρω κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Υπήρξε σημαντικά λιγότερη σύνθεση PGE₂ (p=0,036) και λιγότερη hTERT (p=0,005), τους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο σταδίου Dukes C/D συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο σταδίου Dukes A/B. Αυτό μπορεί να υπονοεί ότι σε αρχικά στάδια νόσου το φυσιολογικό επιθήλιο του εντέρου μπορεί να είναι πιο ευπαθές σε δημιουργία όγκου μέσω της τελομεράσης, ενώ σε προχωρημένα στάδια νόσου το δυναμικό αυτό μειώνεται ή μπορεί επίσης να υπάρχει ανεπάρκεια της αναγεννητικής διαδικασίας στο φυσιολογικό ιστό σε προχωρημένη νόσο με καρκίνο εντέρου. Επίσης μπορεί αυτό να υποδηλώνει ότι στα αρχικά στάδια το φυσιολογικό μικροπεριβάλλον (στρώμα) των ασθενών μπορεί να είναι πιο επιδεκτικό στην δημιουργία όγκων μέσω του μονοπατιού της COX-2, ενώ σε προχωρημένο στάδιο νόσου η επέκταση του καρκίνου μπορεί να μειώνει αυτή την ικανότητα.

Στους καρκίνους του δεξιού κόλου υπήρχε λιγότερη σύνθεση PGE₂ και περισσότερη έκφραση hTERT, συγκριτικά με τους καρκίνους του αριστερού κόλου και του ορθού στους οποίους παρουσιάζεται αυξημένη αλλά μη σημαντική σύνθεση PGE₂ και μειωμένη αλλά στατιστικά σημαντική έκφραση hTERT (p=0,006).

Στο in-vitro πειραματικό πρωτόκολλο, αυξημένη έκφραση των υποδοχέων σωματοστατίνης (sst1, sst2, sst5) επιβεβαιώθηκε και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές (Caco-2 & HT-29) με RT-PCR. Επιπλέον με χρήση ανοσοκυτταροχημείας ανιχνεύτηκε η έκφραση των πρωτεϊνών των sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4, sst5, στη μεμβράνη και των δύο κυτταρικών σειρών. Η επίδραση οκτρεοτίδης ασκεί αντι νεοπλασματική δράση στα (Caco-2 & HT-29) μέσω της πρωτεΐνης των τυροσινικών φωσφατασών (PTPs). Η επίδραση ινσουλίνης ασκεί τροφική δράση στα (Caco-2 & HT-29), καθώς η οκτρεοτίδη αντιστρέφει την δράση της και στις δύο κυτταρικές σειρές. Το Na₃VO₄, προκαλεί καταστολή της δράσης της οκτρεοτίδης και στις δύο κυτταρικές σειρές. Οι δύο κολονικές σειρές (Caco-2 & HT-29) αναπτυσσόμενες σε

θρεπτικό υλικό 10%FBS, υπό την επίδραση οκτρεοτίδης συμπεριφέρονται διαφορετικά στην ενεργότητα της τελομεράσης, ένδειξη διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών.

Συμπεράσματα - Εφαρμογές: Τα ευρήματα μας υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση της ύπαρξης των πολλαπλών μοριακών οντοτήτων στο ευρύ φάσμα του ΟΚΚ. Οι διαφορές που εμείς και άλλοι έχουμε βρει όσον αφορά την ενεργότητα της τελομεράσης, την έκφραση της COX-2, στο καρκίνο του παχέος έντερου και του ορθού, μπορεί να σχετίζονται με την ποικιλομορφία της καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εξέλιξη της νόσου στις διαφορετικές εντοπίσεις του όγκου στο έντερο μπορεί να αποδοθούν στη ξεχωριστή εμβρυολογία, ανατομία, φυσιολογία, και μοριακή βιολογία του κάθε τμήματος του παχέος εντέρου και του ορθού. Μέσω των αποτελεσμάτων μας επιβεβαιώσαμε ότι το παχύ έντερο και το ορθό φαίνεται να αποτελούν ξεχωριστές οντότητες με διαφορετικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Επιπλέον η COX-2 φαίνεται να εμπλέκεται στα αρχικά στάδια εξέλιξης του ογκογενετικού μηχανισμού του ΟΚΚ και συγκεκριμένα επηρεάζοντας αρχικά τον ξενιστή του όγκου (μικροπεριβάλλον του στρώματος) στα φυσιολογικά κύτταρα και μετέπειτα στα επιθηλιακά κύτταρα του ίδιου του όγκου. Θεραπεία ίσως θα πρέπει να δοθεί για την πρόληψη του ΟΚΚ παρά για την καταστολή της εξέλιξης αυτού ιδιαίτερα στους όγκους του αριστερού κόλου και του ορθού στους οποίους η έκφραση βρέθηκε μεγαλύτερη.

Η διαφορά στην έκφραση p53 μεταξύ δεξιού και αριστερού κόλου (και ορθού) σε συνδυασμό με την πιθανή προγνωστική σημασία του p53 θα συμβάλει ενδεχομένως στον καλύτερο σχεδιασμό χημειοθεραπευτικής αγωγής. Επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν και με ποιόν τρόπο η έκφραση του p53 θα μπορούσε να σχετίζεται με την απόκριση των ασθενών σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα.

Τα δεδομένα της in-vitro μελέτης μας δείχνουν ότι η αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου, μειώνοντας την ινσουλίνη και τον IGF-1 (τροφικοί παράγοντες), ίσως καταστείλει την ογκογενετική εξέλιξη σε συγκεκριμένες τουλάχιστον περιοχές στο παχύ έντερο και το ορθό. Η χρήση της οκτρεοτίδης θα μπορούσε να παρέχει θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση ασθενών με ΟΚΚ σε συγκεκριμένες περιοχές του παχέος εντέρου και του ορθού.

PHD THESIS GENERAL ABSTRACT

Background: Colorectal cancer (CRC) is one of the commonest cancers and the third leading cause of cancer death in both sexes. The disease progresses as a multi-step process and is associated with genetic alterations and epigenetic changes. Throughout this mutation process telomerase activation (hTERT) plays a catalytic role in the tumor progression cascade. During the last decade multiple studies have linked the cyclooxygenase-2 (COX-2) expression with the pathogenesis of various types of cancers, included the CRC. Although the actual mechanisms that control COX-2 expression have not been widely understood, it has been shown that stroma cells of both, tumors and the adjacent normal tissues, contribute to COX-2 over-expression resulting in PGE2 synthesis from arachidonic acid. Peptide hormone somatostatin and its receptors (sstr) have a wide range of physiological functions and play a role in the treatment of numerous human diseases, including CRC. Somatostatin and its synthetic analogue, octreotide, are potentially active against CRC due to their anti-proliferative and apoptosis-induced activity. Octreotide inhibits growth of colonic cancer cells. Insulin is a peptide hormone produced by the beta pancreatic cells, and it has also been shown to initiate mitogenic signals in certain cell types, acting as a trophic factor in tumor cells.

Methods – Aims: The aim of this study is to evaluate the in-vivo telomerase activity by [Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)] in colon and rectal cancer tissues and their corresponding adjacent normal mucosal tissues [10cm away from the tumor]. We compared hTERT in tumors located in different colon locations [right colon, left colon and rectum] and analyzed the association between hTERT with patients' clinicopathological features [sex, age, BMI, smoking habits, tumor differentiation (grade), Dukes & TNM stage] and survival. We also studied MLH1 as an indicator of Microsatellite Instability (MIS), while p53 and other molecular markers [Ki-67, Bcl-2] were also studied and correlated with telomerase activity. Our aim also is to study the immunohistochemistry expression of COX-2 together with PGE2 synthesis on CRC and to correlate with a) clinicopathological parameters of the patients and

b) telomerase activity (hTERT). Furthermore the in-vitro aim of study was to subsequently study the effects of the somatostatin analogue octreotide with or without the trophic effects of insulin on cellular proliferation of colon cancer cell lines (Caco-2 & HT-29) and octreotide action in correlation with hTERT. We also investigated the effect of the protein of tyrosine phosphatases (PTPs) and telomerase activity on cellular proliferation.

Results - Discussion: In our study we included 49 patients (21 women) with a median age of 74 (range 49–87) years with biopsy-confirmed CRC. There was a significantly higher telomerase activity in colon cancer tissue compared to normal tissue ($p=0,006$). Adenocarcinomas of the colon cancers express significantly higher hTERT compared to rectal cancers ($p=0,012$). The same was repeated in the adjacent normal tissues ($p=0,035$). Furthermore colon cancers and their adjacent normal tissues had significantly more telomerase and were more positive to MLH1 compared to rectal cancers. The expression of p53 was negatively correlated to telomerase activity but was linked to better patient survival. As far as the immunohistochemistry expression of COX-2 is concerned, that was positively expressed in 40 out of 49 cancer tissues (81.6%). The immunostaining was cytoplasmic, heterogeneous and its intensity was ranged from mild to intense. COX-2 was also expressed in less extend in tumor stroma. The same COX-2 expression was also observed in the adjacent normal tissue stroma cells. The latter was also confirmed when PGE2 synthesis was found to be higher in normal mucosa tissues compared to the adjacent cancer tissues ($p=0,013$). There was no statistical significant relation of COX-2 expression with the above-mentioned patients' clinicopathological parameters. Interestingly, adjacent normal tissue of Dukes-C/D stage tumors had significantly less PGE2 synthesis ($p=0,036$) and lower telomerase activity (hTERT) ($P=0,005$), than adjacent normal tissue of Dukes A/B-stage tumors. These results might imply that in early stages normal epithelium or its surrounding stroma cells might be more susceptible to new telomerase or COX-2 respectively, driven tumor formation while in late stages the extent of the systemic illness may decrease this potency or that there might be a less powerful regeneration process of the normal colonic epithelium in late stages of colon cancer. When tumors were grouped by a) right colon (cecum, ascending colon, transverse co-

lon), we observed higher hTERT activity and less PGE2 synthesis and b) by left colon (splenic flexure, descending colon, sigmoid and rectal cancers), we observed more but not significant PGE2 synthesis and significantly lower hTERT activity ($p=0,012$). The in-vitro experimental protocol, determined elevated expression of sst_1 , sst_2 and sst_5 in both colon cancer cell lines (Caco-2 & HT-29) by RT-PCR. Immunocytochemistry detected sst_1 , sst_{2A} , sst_{2B} , sst_3 , and sst_4 and sst_5 protein expression in the membranes of both cell lines. Octreotide treatment inhibited the proliferation of Caco-2 and HT-29 cells through the protein of tyrosine phosphatases (PTPs). Insulin treatment exerted proliferative effects while octreotide reversed its effect in both cell lines. Sodium orthovanadate (Na_3VO_4) suppressed the anti-proliferative effect of octreotide both in Caco-2 and HT-29 cells. After octreotide treatment, colonic cancer cell-lines (Caco-2 & HT-29), that grow in cultured medium (10%FBS), exert their action on hTERT, through different signaling pathways.

Conclusions - Applications: Our findings further support the concept of multiple molecular entities within the spectrum of CRC. The differences that others and we have identified in telomerase activity and COX-2 expression, in colon and rectal cancers may be related to the diversity of carcinogenesis and disease progression mechanisms in these distinct locations that can be attributed to their discrete embryology, anatomy, physiology and molecular biology. We confirmed that colon and rectum behave as different entities (organs) with different characteristics and properties. Furthermore it seems like COX-2 is implicated in the initial steps of colorectal carcinogenesis progression, affecting initially the adjacent normal colon surrounding stroma cells and then move to colon cancer epithelial cells. Treatment should only be given for the prevention of CRC, especially for the left colon and rectum where COX-2 was highly expressed. The difference in p53 expression between right – left colon and rectum together with p53 prognostic role, will positively contribute to a better design of chemotherapy treatment. It would be thus important to investigate in which way p53 expression could benefit patient's response on particular chemotherapeutic regimens. Our in-vitro data indicate that the treatment of metabolic syndrome (insulin resistance), may suppress carcinogenesis at least in certain locations on colon and rectum. The use of octreotide could pro-

vide a possible therapeutic approach for the treatment of patients with colon cancer at certain locations in the colon and rectum.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Παθογένεια καρκίνου παχέος εντέρου και ορθού

1.1 Επιδημιολογία

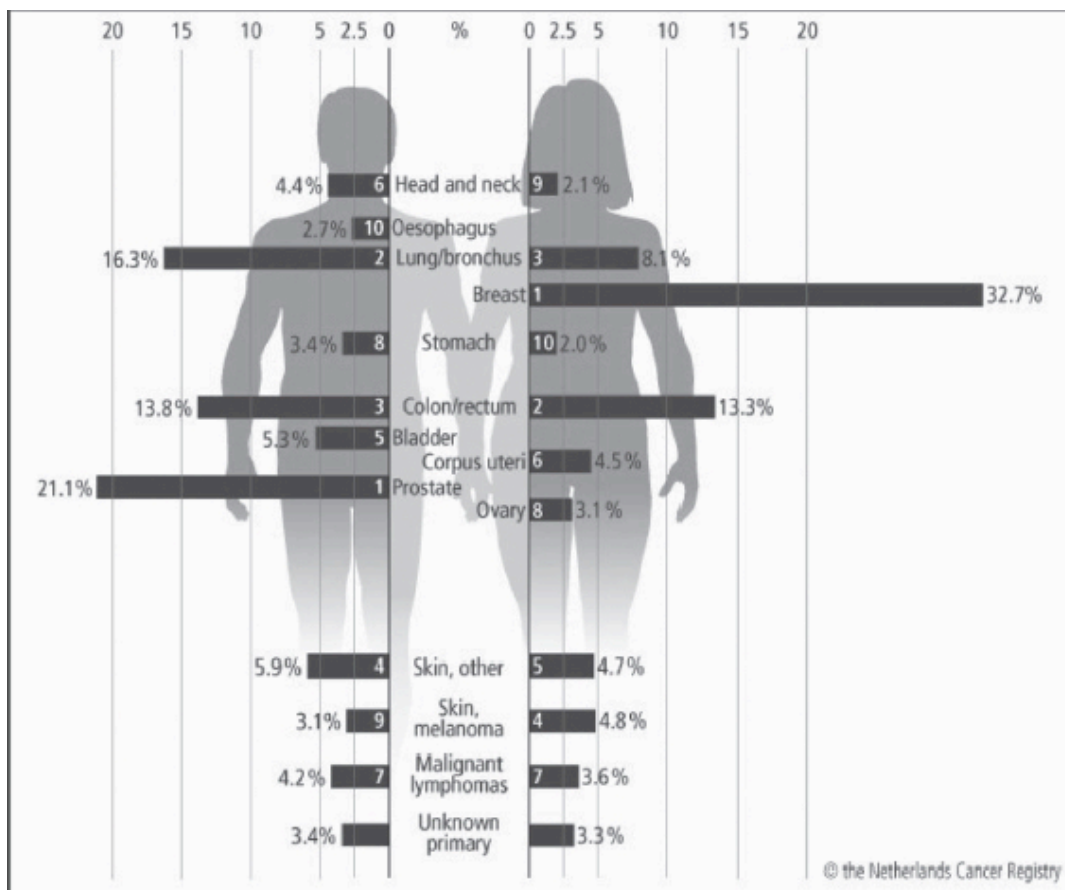
Ο ορθοκολικός καρκίνος (ΟΚΚ) αποτελεί σήμερα μια από τους πιο συχνές κακοήθειες. Το 2006, περισσότερες από 410,000 νέες περιπτώσεις ασθενών με ΟΚΚ είχαν διαγνωσθεί στην Ευρώπη (ποσοστό ~13% όλων των καρκίνων) και περισσότερες από 207,000 περιπτώσεις ασθενών πέθαναν από την νόσο [1].

Ο ορθοκολικός καρκίνος έχει συσχετιστεί με τον τρόπο ζωής και τις συνήθειες του Δυτικού κόσμου. Η υψηλότερη επίπτωση καταγράφεται στην Βόρεια Αμερική, Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία και Δυτική Ευρώπη. Οι αναπτυσσόμενες περιοχές όπως η Αφρική και Ασία τείνουν να αναπτύσσουν χαμηλότερη επίπτωση της νόσου. Επιδημιολογικές μελέτες σε μετανάστες ασθενείς, έδειξαν ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου, ακόμα και από τις γενετικές διαφορές ανάμεσα στους διαφορετικούς πληθυσμούς [2].

Ο ορθοκολικός καρκίνος έρχεται τρίτος σε συχνότητα μετά από τον καρκίνο προστάτου και πνεύμονα στους άνδρες και δεύτερος μετά από τον καρκίνο μαστού στις γυναίκες (Σχήμα 1). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η επίπτωση αυξήθηκε στους άνδρες κατά 1% ετησίως, ενώ στις γυναίκες η αύξηση της επίπτωσης ήταν κατά πολύ χαμηλότερη [3].

Ο καρκίνος παχέος εντέρου και ορθού είναι νόσος της ενήλικου ζωής με κορυφαία επίπτωση την ηλικία των 60-74 χρόνων.

Η επίπτωση αυτή αναμένεται να αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση του ορίου ηλικίας. Γενικότερα ο συσσωρευτικός κίνδυνος στη ζωή για ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου και ορθού είναι 5% στην ηλικία των 75 ετών.



Σχήμα 1. Ποσοστά των 10 πιο συχνών κακοηθειών ανάμεσα σε άντρες και γυναίκες.
(Από: The Netherlands Cancer Registry)

1.2 Αιτιολογία ανάπτυξης ΟΚΚ

Ο ΟΚΚ είναι συνήθως σποραδικός και κληρονομείται σε ένα 5% των περιπτώσεων [4, 5]. Άτομα με πρώτου βαθμού συγγενείς με ΟΚΚ εμφανίζουν 2-3 φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [6, 7]. Ενώ τα ακριβή αίτια του σποραδικού ΟΚΚ δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί, πιστεύεται ότι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και ο τρόπος ζωής επηρεάζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου.

1.2.1 Γενετικοί παράγοντες

Υπάρχουν σύνδρομα με ΟΚΚ, στα οποία οι ασθενείς μεταφέρουν γενετικές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα τους. Τα πιο γνωστά από αυτά τα κληρονομικά σύνδρομα είναι το

FAP (σύνδρομο πολλαπλής πολυποδίασης), το σύνδρομο Lynch (HNPCC – κληρονομικός μη πολυποδικός ορθοκολικός καρκίνος). Το σύνδρομο FAP κληρονομείται με τον αυτοσωμιακό επικρατούντα τρόπο, κατά τον οποίον οι ασθενείς αναπτύσσουν εκατοντάδες έως χιλιάδες πολύποδες στο παχύ έντερο. Αυτοί οι πολύποδες έχουν την τάση να εξελιχθούν σε καρκίνο. Οι ασθενείς έχουν γονιδιακή μετάλλαξη του γονιδίου APC (Adenomatous Polyposis Coli). Αυτή η μεταλλαγή μπορεί να πυροδοτήσει ογκογένεση, με αποτέλεσμα ασθενείς φορείς της να αναπτύσσουν πολύποδες πολύ νωρίς μόλις από την παιδική ή την εφηβική τους ζωή [4].

Αποτέλεσμα είναι η μετάπλαση ενός ή περισσότερων πολυπόδων σε καρκίνο πριν την ηλικία των 40 [4]. Επιπρόσθετα, αυτοί οι ασθενείς αναπτύσσουν όγκους στο λεπτό έντερο και το στομάχι [8]. Το σύνδρομο Lynch είναι ο πιο συχνός κληρονομικός καρκίνος με ποσοστό 1-5% των καρκίνων παχέος εντέρου [4]. Όπως και το σύνδρομο FAP, έτσι και το σύνδρομο Lynch μεταβιβάζεται με τον αυτοσωμιακό επικρατούντα τρόπο και οι ασθενείς αναπτύσσουν καρκίνο παχέος στην διάμεση ηλικία των 45 ετών [8]. Σε αντίθεση με το FAP, στο σύνδρομο Lynch οι ασθενείς δεν εμφανίζουν πολυποειδή αδενώματα αλλά κληρονομούν ανεπάρκεια στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση λαθών κατά την μεταγραφή, όπως τα MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 και PMS2. Αποτέλεσμα είναι οι ασθενείς αυτοί να έχουν 80% κίνδυνο κατά την διάρκεια της ζωής τους να αναπτύξουν ΟΚΚ [7]. Σε αντίθεση με το σύνδρομο FAP, το έλλειμμα στο γονιδίωμα στο σύνδρομο Lynch έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζει την εξέλιξη του καρκίνου. Έτσι λοιπόν οι όγκοι που προέρχονται από αυτό το σύνδρομο είναι γενετικά ασταθείς, οδηγώντας σε συσσώρευση μεταλλαγών με συνέπεια την ταχεία εξέλιξη του καρκίνου. Το 70% των καρκινωμάτων που προέρχονται από το σύνδρομο Lynch εντοπίζονται στο εγγύς τμήμα του παχέος εντέρου (κεντρικότερα της σπληνικής καμπής) [8]. Επίσης οι ασθενείς αυτοί ενδέχεται να αναπτύξουν καρκίνους σε 7 άλλα όργανα εκτός του παχέος εντέρου, όπως το ενδομήτριο, οι ωοθήκες, το λεπτό έντερο, το στομάχι, το επιθήλιο χοληφόρων, το ουροθήλιο και ο εγκέφαλος [8-10].

Πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί ένα νέο σύνδρομο, το MYH-associated polyposis (MAP) syndrome, το οποίο μεταβιβάζεται με τον αυτοσωμιακό υπολειπόμενο τρόπο, κατά το οποίο

οι ασθενείς κληρονομούν αρχική μεταλλαγή και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου MYH. Ο ρόλος της πρωτεΐνης του γονιδίου αυτού βρίσκεται στο σύστημα επιδιόρθωσης βάσεων (Base excision repair – BER). Οι ασθενείς με αυτό το σύνδρομο αναπτύσσουν επίσης πολλαπλά αδενώματα, αλλά πάντα λιγότερα από αυτούς με FAP [11-13]. Άλλα πιο σπάνια κληρονομικά σύνδρομα με πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου είναι το σύνδρομο της νεανικής πολυποδίασης (Juvenile polyposis) με μεταλλαγή στα γονίδια SMAD4 and BMPR1A, το σύνδρομο Cowden, με μεταλλαγή στο γονίδιο PTEN και το σύνδρομο Peutz-Jeghers, με μεταλλαγή στο γονίδιο LKB1. Αυτά τα νοσήματα χαρακτηρίζονται από πολλούς αμαρτωματώδεις πολύποδες στο γαστρεντερικό σωλήνα [4, 8, 10].

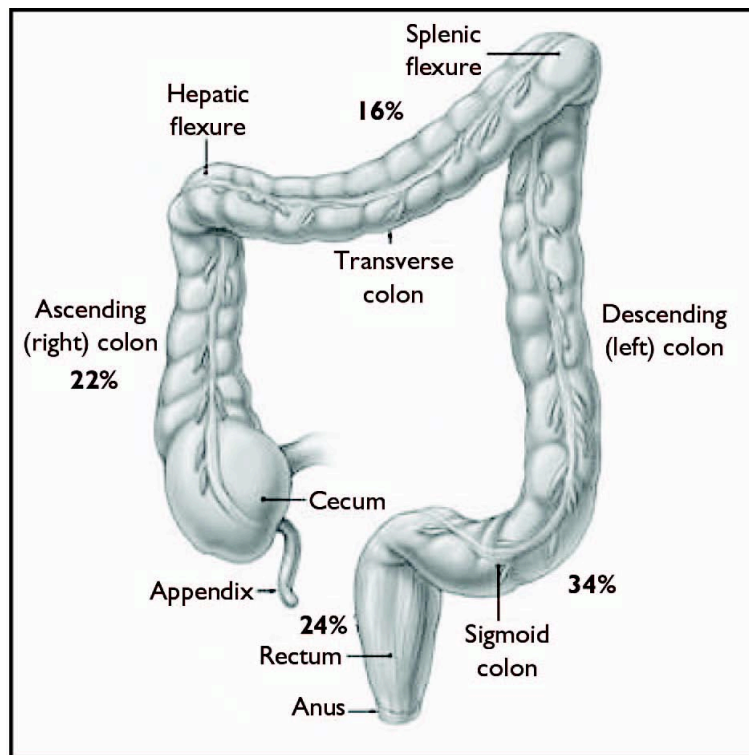
1.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η ηλικία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου στην ανάπτυξη ΟΚΚ στον γενικό πληθυσμό. Άλλοι παράγοντες που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΟΚΚ είναι οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου όπως είναι η ελκώδης κολίτις και η νόσος του Crohn [14, 15]. Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης ΟΚΚ εξαρτάται από τον βαθμό και την διάρκεια της νόσησης από φλεγμονώδη νόσο. Έτσι διαμορφώνεται στο 2% πιθανότητα ανάπτυξης ΟΚΚ μετά από 10 χρόνια νόσησης από ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, 8% για 20 χρόνια, και 18% για 30 χρόνια [6]. Η σημαντικότητα της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθογένεια του ΟΚΚ τονίζεται από την υψηλή επίπτωση της νόσου στις Δυτικές κοινωνίες και ανάμεσα στους μετανάστες που μετακινήθηκαν από περιοχές με χαμηλό κίνδυνο σε περιοχές με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης ΟΚΚ. Έχουν αναφερθεί θετικές συσχετίσεις με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΚΚ και τύπου διατροφής όπως είναι η δίαιτα πλούσια σε λίπος, κόκκινο κρέας [16-18]. Θετική συσχέτιση έχει αναφερθεί μετά από λήψη αλκοόλ [19, 20] αλλά και στο κάπνισμα [18, 21-23]. Αντίθετα, μειωμένο κίνδυνο για ανάπτυξη ΟΚΚ εμφάνισε η διατροφή πλούσια σε ίνες και λαχανικά [24], η φυσική άσκηση [25-27] και η λήψη μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ). Παρόλα αυτά, πολλοί από αυτούς τους συσχετισμούς είναι σημεία αντιλογίας [23, 28-30].

1.3 Παθολογία

Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο κυριότερος ιστολογικός τύπος του ΟΚΚ, ο οποίος αποτελεί το 90% όλων των κακοηθειών του παχέος εντέρου. Το 60% των κακοηθειών του παχέος εντέρου προέρχονται από το περιφερικό κόλον, ήτοι περιφερικότερα της σπληνικής καμπής, παρόλο που η επίπτωση ανάπτυξης καρκίνου δεξιού κόλου τείνει να αυξάνεται [31, 32] (Σχήμα 2).

Μακροσκοπικά ο ΟΚΚ έχει πολυποειδή ή ελκωτική εμφάνιση. Ειδικότερα στο εγγύς-δεξιό κόλον στο οποίο η διάμετρος του εντέρου είναι μεγαλύτερη, επιτρέπεται ανεμπόδιστα η ενδοαυλική ανάπτυξη του καρκίνου. Ο ΟΚΚ δύναται επίσης να αναπτυχθεί δακτυλιοειδώς προκαλώντας «τοπική περίσφιξη και στένωση του αυλού», με αποτέλεσμα να δίνει την τυπική ακτινολογικό εικόνα «δίκην φαγωμένου μήλου» στο βαριούχο υποκλυσμό. Αυτή η ανάπτυξη εμφανίζεται συνήθως στο περιφερικό παχύ έντερο.



Σχήμα 2. Ανατομία παχέος εντέρου. Ποσοστιαία αναλογία ανατομικής κατανομής του ΟΚΚ.

Ιστολογικά μπορεί να διακριθούν διάφοροι υπότυποι συμπεριλαμβανομένου και του βλενωδούς καρκινώματος και του καρκινώματος «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου». Επιπρόσθετα ο βαθμός διαφοροποίησης (κατά πόσο προσομοιάζει με τον πρότυπο τύπο κυττάρων του βλενογόνου παχέος εντέρου) εκτιμάται σε χαμηλό, μέτριο, υψηλό. Η έκταση ανάπτυξης του όγκου ταξινομείται ανάλογα του συστήματος TNM του American Joint Committee on Cancer (AJCC) και του International Union against Cancer (UICC). Σε αυτό το σύστημα ταξινόμησης, το T αφορά το βαθμό διήθησης του όγκου στο τοίχωμα του αυλού του παχέος εντέρου. Το N αφορά τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων από το νεοπλασμα και το M αφορά τις απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αυτό το σύστημα TNM αντικατέστησε την ταξινόμηση κατά Dukes η οποία αφορούσε το καρκίνο παχέος εντέρου και χρησιμοποιήθηκε ευρέως από το 1932. Αυτή η ταξινόμηση βέβαια τροποποιήθηκε στην πορεία όπως στο σύστημα ταξινόμησης κατά Astler – Coller, παρόλο που η κεντρική ιδέα παραμένει αναλλοίωτη (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Διάφορα συστήματα ταξινόμησης του ορθοκολικού καρκίνου.

Dukes	Astler-Coller	TNM		Stage
A	A	Tis	N0 M0	0
	B1	T1-2	N0 M0	I
B	B2	T3	N0 M0	II
	B3	T4	N0 M0	
C	C1	T1-2	N+ M0	III
	C2	T3	N+ M0	
	C3	T4	N+ M0	
D	D	Tx	Nx M1	IV

Αντίθετα προς τα δύο προηγούμενα συστήματα, η ταξινόμηση κατά TNM περιλαμβάνει και την κλινική κατηγοριοποίηση (προεγχειρητικά) αλλά και την παθολογοανατομική κατηγοριοποίηση (μετεγχειρητικά). Βασίζονται σε διαφορετικές μεθόδους εξέτασης και υπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς [33, 34]. Γενικά το cTNM αποτελεί

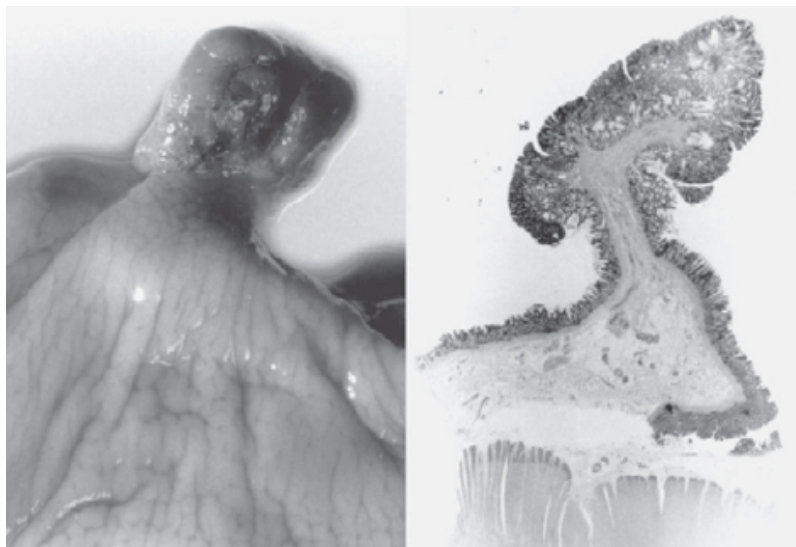
τη βάση για επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και το pTNM αποτελεί την βάση για προγνωστική αξιολόγηση και επικουρική χημειοθεραπεία.

1.4 Παθογένεια – Φαινότυπος

Η αλληλουχία αδενώματος-καρκινώματος, δηλαδή η θεωρία ότι τα αδενώματα είναι μια πρόδρομη μορφή καρκινώματος παχέος εντέρου κυριαρχεί εδώ και πολλές δεκαετίες [35, 36]. Τα αδενώματα προέρχονται από το βλεννογόνο του παχέος εντέρου λόγω αποτυχίας ή λάθους κατά την φυσιολογική οδό πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης. Αυτή η αποτυχία οδηγεί σε μια μεταφορά του πολλαπλασιαζόμενου διαμερίσματος από τα κατώτερα στα ανώτερα στρώματα των κρυπτών, εκεί όπου τα αδιαφοροποίητα κύτταρα συναθροίζονται στην επιφάνεια του αυλού του εντέρου και δημιουργούν τον πολύποδα. Μακροσκοπικά οι πολύποδες διαφοροποιούνται σε μισχωτούς (Σχήμα 3) μέχρι άμισχους (Σχήμα 4). Ο όρος «πολύποδας» συνήθως χρησιμοποιείται για τα αδένωμα, αλλά αυτό μπορεί να μπερδέψει γιατί χρησιμοποιείται επίσης και για άλλου είδους επεγέρσεις βλενογόνου του παχέος εντέρου που δεν αποτελούν όμως πρόδρομη μορφή για αδενοκαρκίνωμα. Επίσης τα αδενώματα δύναται να είναι και επίπεδα. Σε μικροσκοπικό επίπεδο τα αδενώματα φέρουν διαφόρου βαθμού δυσπλασία (ήπιου, μέτριου και υψηλού βαθμού δυσπλασία), τα οποία εμφανίζονται με υπερχρωματικούς και πολυμορφικούς πυρήνες, αυξημένη πυρηνοκινησία, απώλεια προσανατολισμού και ανώμαλη μιτωτική δραστηριότητα. Αυτά τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται επίσης και στα καρκινώματα, μόνο που τα αδενώματα δεν διηθούν γειτονικές ιστικές δομές, ούτε έχουν μεταστατικό δυναμικό. Όσον αφορά την αρχιτεκτονική, οι πολύποδες εμφανίζουν λαχνωτή, σωληνολαχνωτή και σωληνώδη ανάπτυξη. Τα αδενώματα είναι αρκετά συχνά, με εμφάνιση στο 30% του πληθυσμού μέχρι την ηλικία των 60 χρονών. Όμως μόνο το 5% αυτών των αδενωμάτων θα εξελιχθεί σε καρκίνωμα [37]. Η δυνατότητα να ξεχωρίσουν ποια από αυτά τα αδενώματα θα εξελιχθούν σε καρκίνο δεν είναι μακροσκοπικά ασφαλής. Ο κίνδυνος για ένα αδένωμα να εξελιχθεί σε καρκίνωμα εξαρτάται από τρία ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Το μέγεθος του πολύποδα, τη λαχνωτή εμφάνιση, και τη σοβαρότητα της δυσπλασίας. Παρόλο

που οι λαχνωτοί και σωληνολαχνωτοί πολύποδες εμπεριέχουν συχνότερα εστίες καρκινώματος, εντούτοις η επίπτωση είναι επίσης αυξημένη και στους σωληνώδες λόγω μεγαλύτερης συχνότητας εμφάνισης.

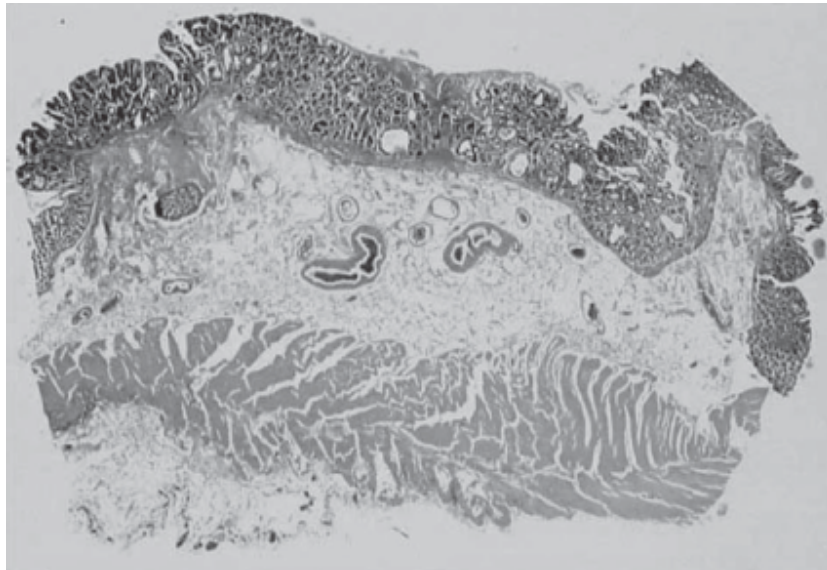
Όλα αυτά τα δεδομένα προέρχονται από διασταυρούμενες πληροφορίες καθώς δεν υπάρχει μακροχρόνια παρακολούθηση και δεδομένα. Ούτε πρόκειται ποτέ να παραχθούν τέτοια αποτελέσματα γιατί είναι αντιδεοντολογικό και ανήθικο (δηλαδή να αφεθούν αδενώματα χωρίς να εξαιρεθούν μέχρι να εξελιχθούν σε καρκινώματα).



Σχήμα 3. Μισχωτό αδένωμα. Μακροσκοπική εικόνα (αριστερά), Μικροσκοπική εικόνα (δεξιά).

Η εξέλιξη αδενώματος σε καρκίνωμα απαιτεί χρόνια για να συμβεί. Δεν υπάρχει όμως επίσημη απόδειξη για τη συγκεκριμένη χρονική διάρκεια που χρειάζεται για να συμβεί αυτή η εξελικτική διαδικασία, καθώς τέτοια αδενώματα αφαιρούνται σύντομα μετά την ανεύρεση τους. Μελέτες σε ασθενείς με σύνδρομο FAP, συνηγορούν ότι η εξέλιξη από αδένωμα σε καρκίνωμα χρειάζεται από 5-15 χρόνια για να συμβεί [36]. Την τελευταία δεκαετία υπάρχουν συσσωρευμένες ενδείξεις ότι οι επίπεδοι και οδοντωτοί πολύποδες δίπλα στους αδενωματώδεις πολύποδες αποτελούν δύο άλλους πρόδρομους φαινότυπους για ΟΚΚ [38-40]. Ενδοσκοπικά τα επίπεδα αδενώματα είτε είναι εντελώς επίπεδες βλάβες, είτε υπερέχουν ελαφρώς με κεντρική υποχώρηση και συνήθως με διάμετρο <1εκ (Σχήμα 4). Συγκρινόμενα

με τα ιδίου μεγέθους πολυποειδή αδενώματα, τα επίπεδα αδενώματα τείνουν να εμφανίζουν σε αυξημένη συχνότητα υψηλόβαθμη δυσπλασία με αυξημένο κίνδυνο για διήθηση [38, 41]. Τα οδοντωτά αδενώματα χαρακτηρίζονται ιστολογικά σαν αδενώματα με οδοντωτό επιθήλιο όπως είναι οι υπερπλαστικοί πολύποδες, αλλά επίσης εμπεριέχουν χαρακτηριστικά συμβατικών αδενωμάτων [42]. Αυτού του είδους οι πολύποδες συχνότερα εμφανίζονται στο εγγύς τμήμα του παχέος εντέρου.



Σχήμα 4. Μικροσκοπική εικόνα επίπεδου αδενώματος.

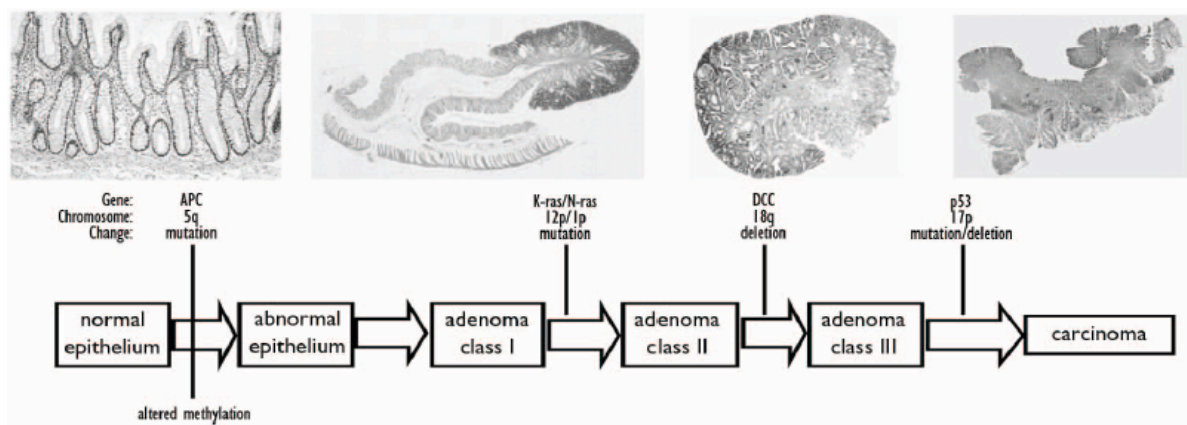
1.5 Παθογένεια – Γονότυπος

Η διεργασία της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και ορθού, από το φυσιολογικό επιθήλιο στο αδένωμα και τελικά στην κακοήγη νεοπλασία είναι πολυσταδιακή και συνοδεύεται από την προοδευτική επίδραση γενετικών και επιγενετικών μεταβολών. Μεταβολές στο γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσουν την ενεργοποίηση γονιδίων που δημιουργούν όγκους (ογκογονίδια). Επίσης μπορεί να προκαλέσουν απενεργοποίηση γονιδίων που αναστέλλουν την δημιουργία όγκων (ογκοκατασταλτικά γονίδια). Τα ογκογονίδια είναι γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εκφράζονται σε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα ή είναι μεταλλαγμένα γονίδια τα οποία υπερλειτουργούν. Οπότε και στις δύο περιπτώσεις διεγείρεται η ανάπτυξη όγκων. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε

ενεργοποίηση ογκογονιδίων περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές μεταθέσεις και ενισχύσεις. Ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι γονίδια που οδηγούν σε ανάπτυξη όγκων μέσω απώλειας της λειτουργίας τους. Το 1971, ο Knudson πρότεινε ότι για να χάσει την λειτουργία του ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, θα πρέπει να απενεργοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα του συγκεκριμένου γονιδίου (the «two hit model») [43]. Οι μηχανισμοί που μπορούν να απενεργοποιήσουν ογκοκατασταλτικά γονίδια περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, σημειακές απαλειφές και υπερμεθυλώσεις στην περιοχή του υποκινητή.

1.5.1 Γενετική αστάθεια

Το πρώτο γενετικό μοντέλο καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και ορθού προτάθηκε από τους Fearon and Vogelstein το 1990 [44], όπου τονίζεται ο ρόλος των μεταλλάξεων και της απώλειας ετεροζυγωτίας συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως είναι π.χ. APC, DCC και p53 καθώς και μεταλλάξεις του ογκογονιδίου KRAS (Σχήμα 5).

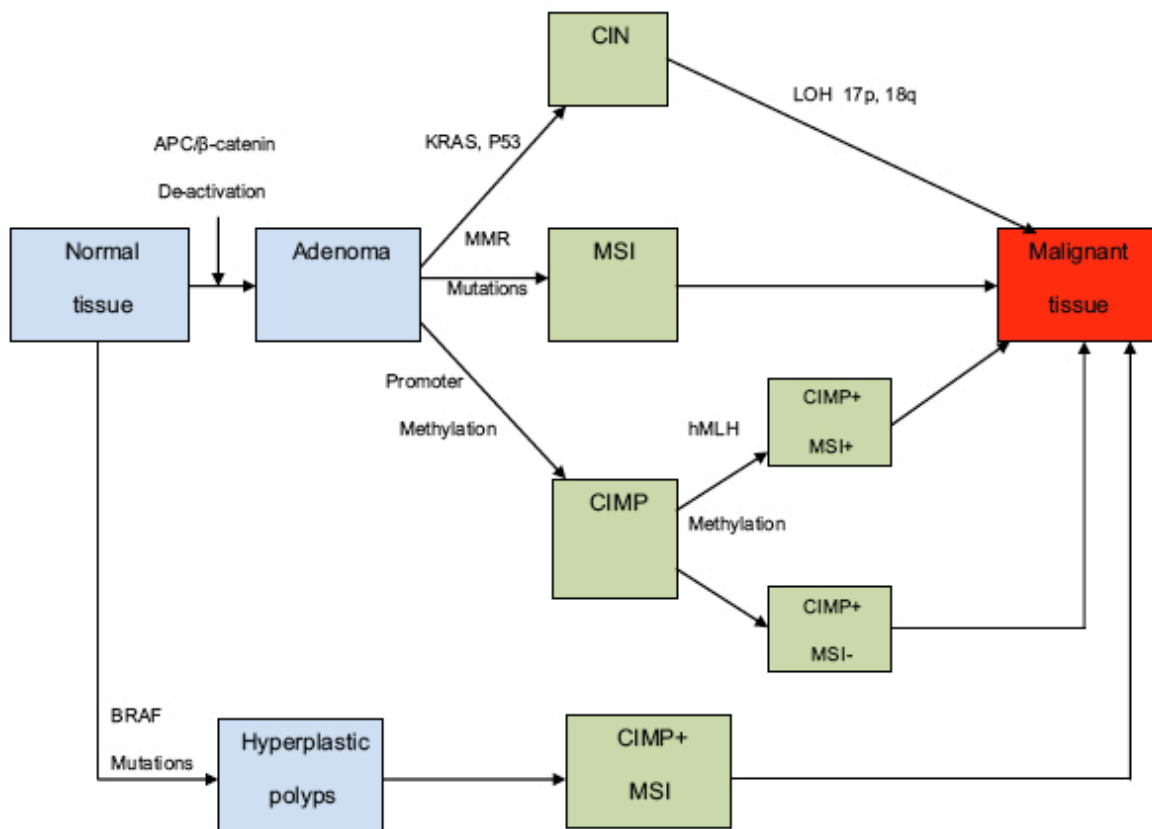


Σχήμα 5. Γενετικές αλλαγές στο πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης του ΟΚΚ [44].

Η μεταμόρφωση από το φυσιολογικό επιθήλιο σε κακοήγη διηθητικό όγκο, περιλαμβάνει πολλαπλές βιολογικές διαδικασίες, όπως π.χ. κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απόπτωση, αθανатоποίηση, αγγειογένεση, διήθηση και μετάσταση [45]. Για την καθιέρωση αυτών των διεργασιών χρειάζονται πολλές γενετικές αλλαγές, οι οποίες οδηγούν σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση συγκεκριμένων βιολογικών μονοπατιών. Ένα γενετικά ασταθές περιβάλλον

το οποίο επισυμβαίνει νωρίς στην διαδικασία της ογκογένεσης, είναι προϋπόθεση για την εξέλιξη του αδενώματος σε καρκίνωμα [46, 47].

Πρόσφατες έρευνες προσδιόρισαν τον ορθοκολικό καρκίνο (ΟΚΚ) σαν μια ετερογενή νόσο και αναγνωρίστηκαν τέσσερα μοριακά μονοπάτια που οδηγούν σε κακοήγη μετάπλαση. Τα τέσσερα αυτά μονοπάτια που περιγράφονται σαν, α) μονοπάτι χρωμοσωμικής αστάθειας - Chromosomal Instability (CIN) Pathway, β) μονοπάτι φαινοτύπου μεθυλίωσης νησίδων CpG - CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) pathway, γ) μονοπάτι μικροδορυφορικής αστάθειας - microsatellite Instability pathway και δ) Serrated pathway, χαρακτηρίζονται από επικράτηση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών [48] (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση της γνωστής ακολουθίας - (αδένωμα σε καρκίνωμα).

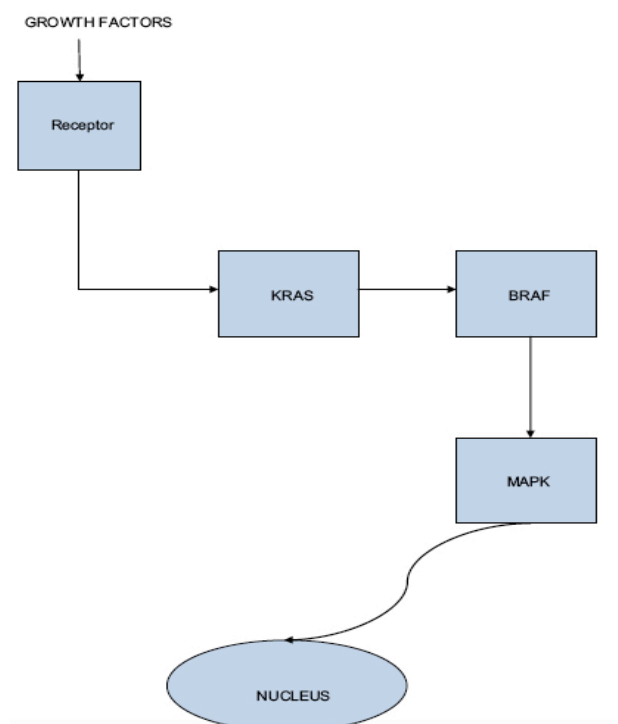
1.5.1.1 Μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας - The chromosomal instability pathway (CIN)

Είναι η πιο συχνή γενετική ανωμαλία που συμβαίνει στον ορθοκολικό καρκίνο και αφορά το 85% των περιπτώσεων [49]. Αυτή η ανωμαλία χαρακτηρίζεται από ανευπλοειδία και ακόμα από δομικές αλλαγές στα χρωματοσώματα τα οποία μπορούν να διερευνηθούν με DNA κυτταρομετρία ροής [50]. Παρόλο που αναγνωρίζεται ευρέως ότι ο ΟΚΚ με αυτή την ανωμαλία έχει πολύ φτωχή πρόγνωση, εντούτοις δεν έχει διευκρινιστεί ο μοριακός μηχανισμός που καταλήγει σε αυτή την ανωμαλία [51]. Αυτό το μονοπάτι συνοδεύεται από μεταλλαγή στο γονίδιο APC η οποία μπορεί να συνυπάρχει με απαλειφές στα χρωματοσώματα 5, 18q ή 17p [52]. Είναι γνωστό ότι το μακρύ σκέλος του γονιδίου 18 φέρει τα γονίδια DCC (Deleted in Colorectal Cancer), SMAD2 και SMAD4, από τα οποία τα δύο τελευταία παίζουν σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι TGFb [53]. Μεταλλαγές στο γονίδιο SMAD4 έχει φανεί να οδηγούν στο σύνδρομο της Νεανικής Πολυποδίασης, το οποίο επίσης συνδυάζεται με ΟΚΚ [54]. Ακόμα ένα γονίδιο που παίζει ρόλο σε αυτό το μονοπάτι είναι το KRAS, το οποίο διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στο μονοπάτι CIMP κατά την εξελκτική διαδικασία καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και ορθού [55].

Κληρονομήσιμες μεταλλαγές στο γονίδιο APC είναι γνωστό ότι οδηγούν στην αυτοσωμική επικρατούσα νόσο που είναι γνωστή ως Οικογενής Πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis - FAP), η οποία χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη πολλαπλών αδενωματώδων πολυπόδων στο γαστρεντερικό σωλήνα. Το APC είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και έχει φανεί ότι η μεταλλαγμένη μορφή του συμβαίνει στις πλείστες των περιπτώσεων με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου και ορθού, καθώς και πολύ νωρίς στην ανάπτυξη των αδενωματωδών [56]. Το APC κωδικοποιεί μία μεγαλομοριακή 312 kDa πρωτεΐνη αποτελούμενη από 2843 αμινοξέα. Έχει πολλαπλές λειτουργίες όπως αποδεικνύεται από τα πολλές περιοχές και τομείς που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με διάφορες άλλες πρωτεΐνες όπως b-catenin και οι κινάσες glycogen synthase kinase (GSK) 3b και Bub. Μεταλλάξεις στο APC φαίνεται να είναι υψίστης σημασίας στην έναρξη της εξέλιξης του αδενοκαρκινώματος [57]. Η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης APC είναι να

δέσμεύεται στην b-catenin και μαζί με τις AXIN και GSK, βοηθάται η αποδόμηση του. Μεταλλαγές του γονιδίου APC που οδηγούν σε καρκινογένεση συνήθως προκαλούν ανεπαρκή δέσμευση του APC στην b-catenin [58]. Αποτέλεσμα είναι η άθροιση της b-catenin και η μεταφορά της στον πυρήνα [59].

Το KRAS είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο το οποίο παίζει σπουδαίο ρόλο στη μεταφορά ενδοκυττάρων μηνυμάτων. Αυτό το μονοπάτι αποτελεί κύριο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς η πρωτεΐνη KRAS έχει την δυνατότητα να ενισχύσει εξωκυττάρια σήματα μέσω ποικίλων κυτταρικών υποδοχέων. Το KRAS είναι μια πρωτεΐνη 21kDa και εντοπίζεται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Οι μεσολαβητές του μονοπατιού του KRAS περιλαμβάνουν κινάσες όπως mitogen-activated protein kinase (MAPK), ο οποίες παίζουν ρόλο στην κυτταρική διαίρεση. Οι μεταλλαγές που σχετίζονται με τον ΟΚΚ πιο συχνά βρίσκονται στα κωδικόνια 12 και 13 του εξονίου 1, καθώς και στο κωδικόνιο 61 του εξονίου 2. Αυτές οι μεταλλαγές οδηγούν στην μείωση της ενεργότητας της GTPάσης της KRAS και κατ' επέκταση στην αύξηση της ενεργότητας της η οποία εν συνεχεία προδιαθέτει στην ανάπτυξη και εξέλιξη των πολυπόδων [60] (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού KRAS/BRAF.

Ο προέχων ρόλος που παίζει το KRAS στην παθογένεια του ΟΚΚ επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι μεταλλαγές του KRAS έχουν βρεθεί σε πάνω από το 50% των περιπτώσεων ασθενών με ΟΚΚ [61]. Οι καλοήθεις αδενώματα δεν εκφράζουν μεταλλάξεις στο KRAS [62]. Αυξημένη όμως έκφραση έχει βρεθεί στους δυσπλαστικούς πολύποδες και σχετίζεται με την διαδικασία εξέλιξης από αδένωμα σε καρκίνωμα [63]. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι μεταλλαγές στο KRAS έχουν βρεθεί και σε άλλες κακοήθειες [64].

1.5.1.2 Μονοπάτι φαινοτύπου μεθυλίωσης νησίδων CpG - CpG island methylator phenotype (CIMP)

Αυτό το μονοπάτι ευθύνεται για το 15% όλων των σποραδικών ορθοκολικών καρκίνων (ΟΚΚ) κατατάσσοντάς το ως δεύτερο πιο συχνό αίτιο κακοήθους εξαλλαγής κολονικού ιστού [65]. Αυτό το μονοπάτι χαρακτηρίζεται από επιγενετική αστάθεια που είναι αποτέλεσμα της καταστολής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου λόγω υπερμεθυλίωσης των υποκινητών και της υφιστάμενης υπομεθυλίωσης του ολικού DNA [66]. Οι ακριβείς βιολογικοί μηχανισμοί που καλύπτουν το πιο πάνω μονοπάτι μεθυλίωσης δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί ακόμα.

1.5.1.3 Μονοπάτι μικροδορυφορικής αστάθειας - Microsatellite instability pathway (MSI)

Αυτός ο τύπος της γονιδιακής αστάθειας παρουσιάζεται όταν συμβεί μεταλλαγή σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία βάσεων μέσα στο γονιδίωμα. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι γνωστές ως μικροδορυφόρες (microsatellites). Η ανακολουθία αυτή που γεννάται μεταξύ αυτών των αλληλουχιών στους καρκίνους και στα βλαστοκύτταρα είναι γνωστή σαν μικροδορυφορική αστάθεια [67].

Σε αντίθεση προς το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN), οι βιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στο μονοπάτι (MSI) είναι ευρέως γνωστοί. Αυτό λοιπόν το μονοπάτι είναι στενά συνυφασμένο με το σύστημα MMR (mismatch repair system) το οποίο διορθώνει τα λάθη που γίνονται από την DNA πολυμεράση κατά την αντιγραφή του DNA [68]. Οι

μικροδορυφορικές αλληλουχίες είναι επιρρεπείς στα λάθη κατά την αντιγραφή οπότε κάθε μεταλλαγή που φθείρει την αποτελεσματικότητα του διορθωτικού μηχανισμού (MMR), προδιαθέτει στην ανάπτυξη μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) [69].

Το σύστημα MMR αποτελείται από τουλάχιστον 7 διαφορετικές πρωτεΐνες (MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 and PMS2), οι οποίες συνδέονται με διαφορετικούς τρόπους ώστε να σχηματίσουν εταιροδιμερείς πρωτεΐνες που εν συνεχεία αναγνωρίζουν και διορθώνουν λάθη στην σύντηξη κατά την διάρκεια της αντιγραφής του DNA [70]. Οι ασθενείς με το σύνδρομο Lynch ή τον HNPCC αναπτύσσουν όγκους καθώς φέρουν φυλοσύνδετη μεταλλαγή σε γονίδια του MMR [71]. Μια εναλλακτική οδός που μπορεί να φέρει ανεπάρκεια στο σύστημα επιδιόρθωσης MMR, είναι η σίγαση γονιδίων του MMR μέσω υπερμεθυλίωσης. Αυτός φαίνεται να είναι και ο μηχανισμός που ακολουθεί ο σποραδικός όγκος του παχέος εντέρου. Ειδικότερα, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του MLH1 και η ταυτόχρονη σίγαση αυτού του γονιδίου έχει βρεθεί στους σποραδικούς όγκους [72].

Το μονοπάτι MSI διαφέρει από το μονοπάτι CIN στο ότι παρουσιάζει φυσιολογικό καρυότυπο με μοναδικά γενετικά χαρακτηριστικά [73]. Τα περισσότερα εργαστήρια χαρακτηρίζουν το MSI σαν την παρουσία τουλάχιστον 30% ασταθών κέντρων που βρίσκονται ανάμεσα σε πέντε μονονουκλεοτιδικούς δείκτες (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 και MONO-27), οι οποίοι έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα [74]. Επίσης οι MSI-θετικοί όγκοι υποδιαιρούνται σε MSI-high και MSI-low όγκους ανάλογα με την ποσοτική διαφορά τους σχετικά με τον βαθμό της αστάθειας. Όγκοι με 10-29% ασταθή κέντρα ταξινομούνται σαν MSI-low. Ασθενείς με MSI θετικούς όγκους τείνουν να έχουν καλύτερη πρόγνωση σχετικά με τους CIN-θετικούς όγκους [75, 76].

1.5.1.4 Το οδοντωτό (serrated) μονοπάτι

Αυτό το μονοπάτι μόλις πρόσφατα έχει αναγνωριστεί σαν διαφορετικό μονοπάτι στην καρκινογένεση του ΟΚΚ [77]. Παλαιότερα πίστευαν ότι υπήρχαν δύο ειδών πολύποδες – τα αδενώματα και οι υπερπλαστικοί πολύποδες. Από αυτούς, οι υπερπλαστικοί πολύποδες θεωρούνται καλοήθεις χωρίς δυναμικό κακοήθειας. Τα αδενώματα από την άλλη, ήταν

γνωστό ότι ήταν πρόδρομες βλάβες σε ορθοκολικό καρκίνο. Είναι όμως πλέον προφανές ότι οι χαρακτηριζόμενοι σαν υπερπλαστικοί πολύποδες, εμπεριέχουν μια ετερογενή ομάδα πολυπόδων που κατηγοριοποιούνται σαν traditional serrated adenomas (TSA), sessile serrated adenomas (SSA) και αληθείς υπερπλαστικοί πολύποδες [78]. Οι υπερπλαστικοί πολύποδες αποτελούν τον πιο συχνό τύπο πολυπόδων και αποτελούν το 80% όλων των πολυπόδων του αριστερού κόλου και ορθού. Καθώς υπάρχουν αποδείξεις που συνηγορούν υπέρ της κακοήθους εξέλιξης αυτών των πολυπόδων, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα TSA και SSA εξελίσσονται μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Αυτό αποδεικνύεται από το ότι τα πιο πολλά serrated αδενοκαρκινώματα είναι MSI-low ή μικροδορυφορικά σταθερά (MSS) και ότι προέρχονται από TSA. Περίπου 15-20% των serrated αδενοκαρκινωμάτων έχει βρεθεί να εξελίσσονται από SSA και να είναι MSI-high [79].

Ενώ οι μικροδορυφόρες αλληλουχίες και το CpG island methylation, φαίνεται να διαδραματίζουν αλληλεπικαλυπτόμενους ρόλους σε αυτά τα μονοπάτια, ειδικές μεταλλαγές έχουν ανευρεθεί στο καθένα. Ο ρόλος του KRAS έχει λεπτομερώς διευκρινιστεί σε σχέση με την ακολουθία “αδένωμα-καρκίνωμα”, και οι μεταλλαγές του ογκογονιδίου KRAS έχουν βρεθεί στο 80% των TSA όγκων αλλά πολύ σπάνια στους SSA όγκους [80, 81]. Οι SSA όγκοι τείνουν να χαρακτηρίζονται από BRAF μεταλλαγές [82]. BRAF είναι μέλος της RAF οικογένειας των σερίνης/θρεονίνης κινασών όπως το KRAS και είναι ζωτικής σημασίας συστατικό του ERK/MAPK μονοπατιού [83]. Η ενεργοποίηση του BRAF μέσω του RAS/RAK/MEK/ERK/MAPK ακολουθίας, έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και είναι επίσης γνωστό ότι παίζει επίσης ρόλο στην αναστολή της απόπτωσης [84]. Μια κοινή μεταλλαγή του BRAF που συμβαίνει στο άνθρωπο είναι η αλλαγή από θυμιδίνη σε αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 1796 το οποίο έχει ως αποτέλεσμα στην αντικατάσταση του V600E. Αυτή η μεταλλαγή οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού και επακόλουθο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [85]. Όπως στο KRAS οι μεταλλαγές στο BRAF έχουν εμπλακεί και σε άλλους όγκους και ιδιαίτερα στα κακοήθη μελανώματα [86]. Η επίπτωση των μεταλλαγών BRAF στον ορθοκολικό καρκίνο έχει στενά συσχετισθεί με μια ασυνήθιστη γονιδιακή μεθυλίωση [87].

Ενδιαφέρον έχει που σχεδόν όλες οι μελέτες για τους οδοντωτούς πολύποδες (serrated polyps) έχουν δείξει ότι η επίπτωση των KRAS & BRAF μεταλλαγών έχουν αμοιβαία αποκλειστικότητα [88]. Αυτό δεικνύει ότι μια μεταλλαγή σε κάποιο από αυτά τα ζωτικά συστατικά του μονοπατιού ERK/MAPK είναι ικανή να διεγείρει κακοήγη εξαλλαγή του ορθοκολικού ιστού [89].

1.5.2 Ο ρόλος της φλεγμονής

Η χρόνια φλεγμονή μπορεί δυνητικά να προδιαθέτει σε κακοήγη εξαλλαγή [90]. Αυτό απεικονίζεται από την αυξημένη επίπτωση καρκίνου του εντέρου σε ασθενείς με φλεγμονώδεις εντεροπάθειες (ΙΦΝΕ) [91]. Ο υποκρυπτόμενος μηχανισμός για αυτή την εξαλλαγή φαίνεται να σχετίζεται με την ασυνήθιστη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στα ενδοαυλικά βακτήρια, μαζί με την προδιάθεση για γενετικές μεταλλαγές [92]. Οπότε η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει ένα παιχνίδι πολλαπλών παραγόντων. Κάποια από τα μόρια-κλειδιά που έχουν ανευρεθεί είναι η Cyclo-oxygenase-2 (COX2), ο NF-κB, ο TNF-α καθώς και οι Toll-like receptors (TLR) [93].

Ο ρόλος της COX-2 υπογραμμίζεται σε πειράματα με γενετικά τροποποιημένους επίμυες με απαλοιφή του γονιδίου APC μετά από επίδραση αναστολέα της COX-2, ή σε περίπτωση πλήρους έλλειψης του COX-2, στα οποία φαίνεται να υπάρχει λιγότερη πιθανότητα δημιουργίας πολυπόδων και σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει ακόμα και υποστροφή της ανάπτυξης τους [94].

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η υπερέκφραση της COX-2 οδηγεί σε καρκινωμάτωση δεν έχει πλήρως ακόμα διευκρινιστεί, παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις που να εισηγούνται ότι δουλεύει μέσω κατασταλτικών διαβιβαστών. Η COX-2 μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνη (πρωτίστως PGG₂), η οποία εν συνεχεία μέσω ειδικών συνθέσεων προσταγλανδινών παράγει πέντε δομικά συσχετιζόμενα μόρια προσταγλανδίνης, τα PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ και thromboxane A₂ (TXA₂). Μελέτες γύρω από τον καταρράκτη των αντιδράσεων COX έχουν δείξει ότι η προσταγλανδίνη PGE₂ παίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο στην καρκινογένεση. Πιστεύεται ότι αυτό συμβαίνει μέσω του υποδοχέα της

PGE2 ο οποίος μεσολαβεί για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την προαγωγή της αγγειογένεσης [95, 96]. Η COX ενεργοποιεί πολλούς αγγειογενετικούς παράγοντες όπως είναι ο vascular endothelial growth factor (VEGF) και ο basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) μέσω της δράσης της προσταγλανδίνης PGE2. Απόδειξη αυτού είναι ότι ομόζυγη απαλοιφή του υποδοχέα της προσταγλανδίνης (EP2) σε επιμύες με μεταλλαγμένο APC είχε σαν αποτέλεσμα την μη επαγωγή του VEGF από τα ΜΣΑΦ και οι αντιαγγειογενετικές επιδράσεις των ΜΣΑΦ μπορούσαν να αντιστραφούν από την PGE2 [97, 98]. Ο NF-κΒ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανοσοποιητικής απόκρισης και η ενεργοποίησή του έχει συσχετιστεί με την έκφραση πολλών φλεγμονωδών κυτοκινών, αντι-αποπτωτικών παραγόντων (Bcl-2), αγγειογενετικών παραγόντων ακόμα και με έκφραση της COX2 [99].

Ο TNF-α είναι μέλος των TNF κυτταροκινών και η έκφραση των υποδοχέων TNF έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων μέσω NF-κΒ, ή την ενεργοποίηση κασπασών-8 που παίζουν ρόλο στην απόπτωση [100]. Οι φαινομενικά αντιφατικοί ρόλοι του TNF-α εξαρτώνται από τα επίπεδα του παράγοντα. Η προ-αποπτωτική λειτουργία διεγείρεται μόνο σε υψηλά επίπεδα TNF-α [101]. Πειράματα σε ζώα απέδειξαν ότι η αναστολή του TNF-α είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή της κολίτιδας [102]. Πράγματι τέτοιες μελέτες οδήγησαν τους ερευνητές να εστιάσουν στο TNF-α σαν δυνητική στοχευμένη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα [103]. Η διέγερση ορισμένων TLRs έχει αναφερθεί στις φλεγμονώδεις εντεροπάθειες. Η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε ενδοκυττάρια σήματα τα οποία σταδιακά διεγείρουν την ανάπτυξη διαφόρων προφλεγμονωδών μορίων όπως είναι το μόριο της COX-2 [104]. Μελέτες που έχουν γίνει σε επίμυες με απαλοιφή του TLR4 και εμβολιασμό με κύτταρα καρκίνου παχέος εντέρου, παρουσίασαν αυξημένο προσδόκιμο επιβίωσης [105]. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η έλλειψη βακτηρίων στα μοντέλα επίμυων είχε σαν αποτέλεσμα την κατάργηση πολυποειδικής απόκρισης [106]. Αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν ότι η παρουσία ή η αναγνώριση ενδοαυλικών μικροβίων θα μπορούσε να ήταν αναγκαία για το μονοπάτι της καρκινογένεσης μέσω φλεγμονωδών αντιδράσεων.

1.5.3 Κλινικοπαθολογικοί συσχετισμοί

Παρόλο που τα μοριακά μονοπάτια στην παθογένεια του ορθοκολικού καρκίνου έχουν αποσαφηνιστεί, η σχέση μεταξύ των διαφόρων μεταλλαγών και της μορφολογικής εμφάνισης δεν έχει μελετηθεί. Οι μελέτες που έχουν γίνει έχουν να κάνουν κυρίως με την μορφολογία των αδενωμάτων και των πολυπόδων και τη σχέση τους με την αιτιατή μεταλλαγή. Ο κύριος λόγος της έλλειψης αυτής της γνώσης είναι γιατί τα μονοπάτια της καρκινογένεσης έχουν πολλαπλά στάδια, πράγμα το οποίο ξεχωριστά προσθέτει ακόμα ένα επίπεδο πολυπλοκότητας [107].

Τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά του σποραδικού σωληνώδους αδενώματος καθώς και αυτών που βρίσκονται στην οικογενή πολυποδίαση είναι παρόμοια. Αυτό γιατί και στις δύο αυτές κλινικές οντότητες υφίσταται η ίδια μεταλλαγή στο γονίδιο APC [108]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κυτταροπλασματικές και πυρηνικές αλλαγές. Το γονίδιο APC παίζει και ρόλο στον σχηματισμό μικροσωληνίσκων στο κύτταρο που οδηγούν στη δημιουργία κινετοχώρων κατά την μίτωση. Το μεταλλαγμένο APC οδηγεί σε ανώμαλη λειτουργία των μικροσωληνίσκων, οι οποίοι εν συνεχεία οδηγούν σε ανώμαλο χρωμοσωμικό διαχωρισμό και κατ' επέκταση χρωμοσωμική αστάθεια [109].

Οι αρχικές αλλαγές στους οδοντωτούς πολύποδες είναι οι μεταλλαγές στο BRAF και η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG. Η υπερμεθυλίωση του MMR, έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση πολλαπλών μεταλλάξεων. Αναστέλλεται η ανεξάρτητη απόπτωση μέσω του p53 με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό πολλών crypt cells. Αυτή η αύξηση έχει ως συνέπεια την μείωση της επιφάνειας των κυττάρων οδηγώντας στην οδόντωση αυτών των πολυπόδων [110].

1.5.4 Μεταλλαγές σε συγκεκριμένα μονοπάτια

Πέραν των πιο πάνω παθογενετικών μονοπατιών, υπάρχουν αρκετά άλλα βιοχημικά μονοπάτια τα οποία μετά την επιρροή αφαιρετικών μεταλλαγών προδιαθέτουν την ανάπτυξη κακοηθειών. Αυτές οι μεταλλάξεις δρουν σε σύζευξη με βασικά μονοπάτια όπως περιγράφονται πιο κάτω:

1.5.4.1 Το μονοπάτι TGF-β

Το μονοπάτι του TGF-β συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών βιολογικών διεργασιών όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Υπάρχουν τρεις ισομορφές του TGF-β που εκφράζονται στο επιθήλιο των θηλαστικών με τρόπο ειδικό για κάθε ιστό [51]. Αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β είναι ανάμεσα στις πιο συχνά ευρισκόμενες αλλαγές σε διάφορους καρκινικούς ιστούς [111]. Οι επιδράσεις του TGF-β προάγονται μέσω διάφορων μεσολαβητών (downstream mediators), όπως είναι οι πρωτεΐνες SMAD καθώς και μέλη των μονοπατιών RAS/MAPK, JNK και PI3 kinase/Akt [112]. Πολλοί από τους μεσολαβητές του TGF-β έχουν επίσης επίδραση και στους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου p21, p27, p5 [113]. Μη ενεργοποιημένες μεταλλαγές έχουν αναφερθεί σε γονίδια των υποδοχέων του TGF-β, όπως TGFBR1 and TGFBR2. Φθοροποιές μεταλλαγές στο TGFBR2 έχουν ανευρεθεί στο 30% περίπου όλων των ορθοκολικών καρκίνων και έχει βρεθεί να συσχετίζονται με την εξέλιξη σε καρκίνο από αδένωμα [114]. Το γονίδιο TGFBR2 έχει μικροδορυφορικές περιοχές στα εξόνια 3, 5 και 7, επομένως αυτές οι μεταλλαγές ανευρίσκονται πιο συχνά στους MSI (microsatellite instability) θετικούς όγκους [115]. Περαιτέρω μεταλλαγές στο TGF-β μονοπάτι οι οποίες να έχουν ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση είναι αυτές στις πρωτεΐνες SMAD, και πιο αξιοσημείωτα στην πρωτεΐνη SMAD4 [116].

1.5.4.2 Έλλειψη ετεροζυγωτίας (LOH) του 18q

Η απώλεια του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 18 είναι συχνή σε κυτταρογενετικές ανωμαλίες στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού. Τα γονίδια που ενοχοποιούνται για τα ογκογενετικά αποτελέσματα είναι τα Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC) καθώς και SMAD4, SMAD2 και SMAD7. Ο ρόλος που διαδραματίζουν αυτά τα γονίδια στο μονοπάτι TGF-β υπονοεί ότι η έλλειψη ετεροζυγωτίας στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 18 (18qLOH), προδιαθέτει σε καρκινογένεση μέσω μη διατήρησης του ελέγχου του μονοπατιού του TGF-β [117].

Παρόλο που οι αφαιρετικές μεταλλαγές στο χρωμόσωμα 18 έχουν ενοχοποιηθεί για κακή πρόγνωση, δεν έχουν επιβεβαιωθεί οριστικά μέχρι τώρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές μεθόδους ελέγχου στις διάφορες μελέτες. Η χρήση του 18qLOH για την περίπτωση επιλογής της θεραπείας είναι ακόμα υπό έρευνα [51].

1.5.4.3 Το μονοπάτι του p53

Μια ευρύτερη αναφορά θα γίνει για το τελευταίο μονοπάτι του p53. Μεταλλαγές στο p53 έχουν βρεθεί στο 50% του ορθοκολικού καρκίνου, παγκοσμίως [118]. Το p53 διαδραματίζει πολλαπλούς σημαντικούς ρόλους στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένης και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της επιδιόρθωσης και του πολλαπλασιασμού του DNA. Έτσι λοιπόν δεν είναι παράδοξο ότι μεταλλαγές στο p53 συμβαίνουν με τέτοια υψηλή συχνότητα σε διαφορετικούς καρκίνους. Το p53 είναι μεταγραφικός παράγοντας με ογκοκατασταλτικές ιδιότητες, ο οποίος διεγείρεται από ενδοκυττάρια στρεσογόνα ερεθίσματα όπως μετά από βλάβη του DNA, υποξία, εξάντληση νουκλεοσιδίων και ογκογονιδίων [119]. Η ρύθμιση του p53 γίνεται με συγκεκριμένες τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση, μεθυλίωση και ακετυλίωση μετά από ενεργοποίηση από διάφορους παράγοντες όπως είναι οι cycle checkpoint kinase (CHK), ataxia telengectasia mutated (ATM) και DNA-dependent protein kinase (DNAPK) [120]. Λόγω της πολυπλοκότητας των πολλαπλών μονοπατιών που περιλαμβάνουν το p53, γίνεται προφανές ότι υπάρχουν πολλοί τρόποι να κατασταλεί η δράση του, παρόλα αυτά ο συνηθέστερος μηχανισμός είναι μέσω μιας missence μεταλλαγής που παρεμβαίνει με την ικανότητα του p53 να δεσμεύεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες [121].

1.5.4.4 Το μονοπάτι του EGFR

Το EGFR είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεϊνική κινάση τυροσίνης, η οποία ενεργοποιεί διάφορους μεσολαβητές που παίζουν ρόλο σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και η απόπτωση. Δομικά, το EGFR αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές - μια εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης, μια υδρόφοβο

διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή κινάσης τυροσίνης που ενεργοποιεί μεσολαβητές μέσω φωσφορυλίωσης [122]. Οι ποικίλοι ρόλοι του EGFR επιβεβαιώνονται από την ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών. Γνωστά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις θέσεις υποδοχής του EGFR είναι το μονοπάτι RAS/RAF/MAPK, το μονοπάτι PI3K και το μονοπάτι της πρωτεϊνικής σερίνης/θρεονίνης Akt κινάσης [123].

Ακριβώς λόγω του ρόλου του στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οι μεταλλαγές στο μονοπάτι του EGFR έχουν ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση παχέος εντέρου και ορθού. Αυξημένη έκφραση του EGFR έχει ενοχοποιηθεί για προχωρημένο στάδιο και μεταστάσεις καθώς έχει βρεθεί στο 70% των προχωρημένου σταδίου καρκίνων παχέος εντέρου και ορθού [124]. Η έκφραση του EGFR ανευρίσκεται υψηλότερη στο βάθος του όγκου και συσχετίζεται με την διεισδυτικότητα του όγκου [125]. Η φύση λοιπόν της έκφρασης του EGFR στους καρκίνους του παχέος εντέρου και ορθού τον καθιστά ειδικό όχι μόνο ως δυνητικά προγνωστικό δείκτη αλλά και σαν πιθανό θεραπευτικό στόχο. Βασικά διάφορα φάρμακα έναντι του καρκίνου που στοχεύουν το EGFR έχουν σχεδιαστεί και χρησιμοποιούνται στη μετεγχειρητική χημειοθεραπεία της μεταστατικής νόσου [126].

1.5.5 Μοριακοί Βιολογικοί Δείκτες

Η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία του ΟΚΚ συνοδεύεται με καλύτερη πρόγνωση επομένως όλη η έρευνα στρέφεται στην ανακάλυψη ειδικών μοριακών βιολογικών δεικτών που να ανιχνεύουν σε αρχικά στάδια τον ΟΚΚ. Οι υπάρχουσες τεχνικές (screening) βασίζονται σε ενδοσκοπικές μεθόδους που παρόλο αποτελεσματικές δεν είναι συχνά ανεκτές από τους ασθενείς καθώς επίσης είναι και αυξημένου ρίσκου και κόστους [127].

Το test για ανίχνευση κρυφής αιμορραγίας στα κόπρανα (fecal occult blood testing), χρησιμοποιείται σήμερα και είναι μια απλή και φθηνή μέθοδος. Αυτό το test ανιχνεύει την αιμοσφαιρίνη με δύο τρόπους (ενζυματικά και ανοσοϊστοχημικά). Η ενζυματική μέθοδος βασίζεται στην οξειδωση της αιμοσφαιρίνης στο πεπτικό, χωρίς να μπορεί να διαφοροδιαγνώσει τις διαφορετικές εστίες και αιτίες της αιμορραγίας και μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα ανάλογα της διατροφής και των φαρμάκων που λαμβάνει ο

ασθενής. Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος ανιχνεύει την αιμοσφαιρίνη μέσω αντισωμάτων χωρίς να επηρεάζεται από την εξωγενή λήψη φαγητών ή φαρμάκων. Υπάρχει όμως φτωχή ειδικότητα χωρίς ακόμα να μπορεί να διαφοροδιαγνωστεί αν η αιμορραγία είναι του ανώτερου ή του κατώτερου πεπτικού [128].

Στον ΟΚΚ τα αποπίπτοντα κολονικά κύτταρα είναι αυξημένα συγκριτικά με το φυσιολογικό, με αποτέλεσμα ο έλεγχος των κοπράνων να αποτελεί μια μέθοδο στην οποία τα κύτταρα να μπορούν να αναλυθούν για γενετικές ή και επιγενετικές ανωμαλίες [129]. Σε φυσιολογικό βλεννογόνο παχέος εντέρου η ανίχνευση κολονικών κυττάρων προέρχεται από απόπτωση και χαρακτηρίζεται από κατακερματισμό του DNA (DNA fragmentation) και laddering. Τα καρκινικά κύτταρα από την άλλη έχουν ενισχυμένο προσδόκιμο και δεν επιδέχονται απόπτωση τόσο σύντομα. Το DNA των κυττάρων του ΟΚΚ οπότε, τείνει να μένει ανέπαφο παρέχοντας μια μέθοδο ανίχνευσης του καρκίνου [130]. Μια μελέτη του Boyton και των συνεργατών έδειξε ότι αυτή η μέθοδος έχει ευαισθησία 57% και ειδικότητα 97% [131].

Οι μεταλλαγές του APC είναι γνωστό ότι σχετίζονται με πρόωρες αλλαγές στην εξέλιξη του καρκίνου, επομένως θα ήταν δυνητικά καλός δείκτης ανίχνευσης του ΟΚΚ. Παρόλα αυτά οι μεταλλαγές του APC έχουν βρεθεί στη κωδικοποιημένη περιοχή του γονιδίου καθιστώντας το τεχνικά δύσκολο για την χρησιμοποίησή του σαν διαγνωστικό εργαλείο [132]. Οι μεταλλαγές στο KRAS επίσης σχετίζονται με πρόωρες αλλαγές στην εξέλιξη από αδένωμα σε καρκίνωμα και η συχνότητα που ανευρίσκεται στον σποραδικό ΟΚΚ είναι μεγάλη, επομένως είναι και αυτός δυνητικά ένας καλός δείκτης ανίχνευσης του ΟΚΚ [133]. Παρόλο τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το p53 στους καρκίνους γενικότερα, επειδή οι μεταλλαγές του γονιδίου εμφανίζονται στα τελικά στάδια εξέλιξης του ΟΚΚ δεν θα ήταν κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικό εργαλείο για την πρόωρη ανίχνευση του ΟΚΚ [134].

Το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), είναι μια υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνη που έχει χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης στον ΟΚΚ. Τα υψηλά επίπεδα CEA στον ορό έχουν συσχετιστεί με εξέλιξη της νόσου και υποτροπή [135]. Παρόλα αυτά, υψηλά επίπεδα του CEA έχουν συσχετιστεί και με άλλα νοσήματα όπως ηπατίτιδα, ΧΑΠ, ΙΦΝΕ.

Οπότε τα επίπεδα του CEA δεν παρέχουν ικανή ειδικότητα ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν βιολογικοί δείκτες με δυνατότητα screening-tools. Στην κλινική πρακτική σήμερα τα επίπεδα του CEA χρησιμοποιούνται μόνο για συγκριτική παρακολούθηση πιθανής εξέλιξης της νόσου [136].

Πολλά ερευνητικά κέντρα προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν συνδυασμό βιολογικών δεικτών για να αυξήσουν την ευαισθησία και ειδικότητα των διαφόρων μεθόδων screening. Αυτά περιλάμβαναν μεταλλάξεις του KRAS, APC, p53, αλλά και του BAT26 που είναι δείκτης μικροδορυφόρου αστάθειας MSI [137]. Παρόλα τα υποσχόμενα αποτελέσματα χρειάζονται μεγαλύτερες σειρές για να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα [138].

1.5.6 Προγνωστικοί δείκτες

Η έρευνα είναι στην οδό αξιολόγησης μοριακών χαρακτηριστικών του ΟΚΚ έτσι ώστε να προσδιορίσουν την πρόγνωση. Οι Ogino, *et al.* σε μια μελέτη με 662 ασθενείς, έδειξαν ότι οι ασθενείς που είχαν όγκους με υψηλή έκφραση COX-2 είχαν χειρότερο προσδόκιμο [139]. Το ίδιο απέδειξαν και οι Soumaoro, *et al.* σε παρόμοια μελέτη. Σε αυτή την μελέτη επιπλέον δεν φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση με το COX-1 [140]. Σε άλλη μελέτη του ο Ogino απέδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του BRAF και υψηλής θνητότητας [141]. Επίσης μελέτες από τους Meleci, *et al.* εισηγούνται ότι όγκοι με μικροδορυφόρο αστάθεια (MSI) είναι λιγότερο πιθανόν να συνοδεύονται από απομακρυσμένες μεταστάσεις [142]. Αφαιρέσεις στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 18 έχουν βρεθεί στο 70% των καρκίνων του παχέος εντέρου και ορθού και συνήθως περιλαμβάνουν το DCC γονίδιο το οποίο σε ορισμένες μελέτες συσχετίζεται με μεταστάσεις και κακή πρόγνωση παρόλο που επιβεβαίωση από προοπτικές μελέτες ακόμα εκκρεμεί [143].

Πολλές μεγάλες μελέτες όπως κυρίως η PASCAL I & II απέδειξαν συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξης του KRAS και κακής πρόγνωσης. Άλλοτε άλλες μεταλλάξεις έχουν άλλη επίδραση στην πρόγνωση. Η παρουσία μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12, της γλυκίνης (G) σε βαλίνη (V) του γονιδίου KRAS στα καρκινώματα σταδίου Dukes C έχει συσχετιστεί με

επιθετική συμπεριφορά. Επίσης μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 έχει συσχετιστεί με 40% μεγαλύτερη πιθανότητα θνητότητας [144].

Παρόλο που διάφορες μελέτες συνδέουν την κατάσταση της μικροδορυφορικής αστάθειας με καλύτερη πρόγνωση, στοιχεία από μεγάλες προοπτικές μελέτες ακόμα ελλείπουν. Εν μέρη αυτό οφείλεται στην δυσκολία να γίνουν τέτοιες μελέτες καθώς ο σποραδικός καρκίνος με μικροδορυφορική αστάθεια δεν είναι συχνός [68]. Οι Porat, *et al.* σε μια συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας από 32 μελέτες με 7642 ασθενείς, συμπέραναν ότι ασθενείς με MSI θετικούς όγκους έχουν καλύτερη πρόγνωση από αυτούς με MSS όγκους [145]. Αυτά τα αποτελέσματα συνηγορούν ότι η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τους ασθενείς που μπορεί δυνητικά να αντιμετωπιστούν μόνο με χειρουργείο. Οι MSI θετικοί όγκοι δείχνουν να μην ανταποκρίνονται στην θεραπεία με 5-fluoruracil (5-FU) ανάλογα με το στάδιο της νόσου [146].

Το επιθυμητό όσον αφορά την έρευνα γύρω από τους μοριακούς μηχανισμούς του ορθοκολικού καρκίνου, είναι να προβλέπει την ανταπόκριση κάθε ασθενούς ξεχωριστά στα διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Πολλή έρευνα έχει γίνει σε αυτό το μονοπάτι με αποτέλεσμα να υπάρχει η πιθανότητα να κατηγοριοποιηθούν οι ασθενείς στους ανταποκρινόμενους και μη όσον αφορά την επικουρική χημειοθεραπεία [147].

Το μονοκλωνικό στοχευμένο αντίσωμα έναντι του EGFR χρησιμοποιείται συχνά πλέον σήμερα στους ασθενείς με μεταστατική νόσο. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις του KRAS έδειξαν ότι καθορίζουν την ανταπόκριση των ασθενών στην αντι-EGFR θεραπεία [148].

Ένας άλλος στόχος της επικουρικής χημειοθεραπείας είναι η τοποϊσομεράση-I (topo-) η οποία αναστέλλεται από την ιρινοτεκάνη (irinotecan). Η τοποϊσομεράση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA [149]. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων της τοποϊσομεράσης-I και της ευαισθησίας στην ιρινοτεκάνη. Παρόλο που δεν υπάρχουν τυχαίοποιημένες μελέτες που να το αποδεικνύουν [150], οι Braun, *et al.* (2008) απέδειξαν ότι τα επίπεδα της τοποϊσομεράσης - I είναι προγνωστικά της θετικής ανταπόκρισης στην ιρινοτεκάνη ή στην οξαλιπλατίνη. Επίσης φάνηκε να είναι προγνωστικός δείκτης για χημειοθεραπεία με 5-FU [151].

Άλλα προϊόντα γονιδίων και οι υποδοχείς τους είναι IL-8, EGF VEGF. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί σε αυτά τα γονίδια, έχουν συσχετίσει με ποικίλη ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία και διαφορετική επιβίωση [152]. Παρόλη την πρόοδο που επιτεύχθηκε πολλά πρέπει να γίνουν ακόμα για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος των πολυμορφισμών στον ορθοκολικό καρκίνο που θα βοηθήσει στην παραγωγή καλύτερων θεραπευτικών σκευασμάτων με λιγότερες τοξικές παρενέργειες.

2. Μοριακοί ανοσοϊστοχημικοί δείκτες

2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι τομέας της ιστοπαθολογίας με αντικείμενο την αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων και των ιστών, με χρήση ειδικών αντισωμάτων, σημασμένων με ειδικές χρωστικές τα οποία συνδέονται με αντιγόνα στόχους. Οι χρωστικές αυτές επιτρέπουν την ανίχνευση με το κοινό μικροσκόπιο των μελετώμενων αντιγόνων μετά την σύνδεση τους με τα αντισώματα.

Οι χρησιμοποιούμενοι ειδικοί αντιορροί κατά των διαφόρων αντιγόνων περιλαμβάνουν κυρίως μονοκλωνικά αντισώματα λόγω της υψηλής εξειδίκευσής τους.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται από ένα κυτταρικό κλώνο, δηλαδή από ένα σύνολο κυττάρων με τα ίδια χαρακτηριστικά και ιδιότητες που προέρχονται όλα από το ίδιο μητρικό κύτταρο, που ονομάζεται υβρίδιο και προκύπτει από την εργαστηριακή σύντηξη δύο διαφορετικών κυττάρων: ενός β-λεμφοκυττάρου πειραματόζωου εμβολιασμένου με το συγκεκριμένο προς μελέτη αντιγόνο, και ενός μυελοκυττάρου από κυτταρική καλλιέργεια πολλαπλού μυελώματος. Με αυτό το τρόπο το υβρίδιο συνδυάζει τις κοινές ιδιότητες των δύο, δηλαδή την ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων του β-λεμφοκυττάρου αλλά και την ικανότητα επιβίωσης εκτός του οργανισμού, του μυελοκυττάρου. Τα παραγόμενα από τον συγκεκριμένο κλώνο αντισώματα στρέφονται (σχεδόν αποκλειστικά) κατά του ειδικού αντιγόνου με το οποίο έχει ευαισθητοποιηθεί το πειραματόζωο. Τα κύτταρα του δημιουργηθέντος κλώνου μπορούν να συντηρηθούν, είτε σε βαθιά κατάψυξη, είτε να ενεθούν στην περιτοναϊκή κοιλότητα άλλων πειραματόζωων με αποτέλεσμα την παραγωγή ασκητικού υγρού με υψηλό τίτλο αντισωμάτων.

Αρχική ανοσοϊστοχημική μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι αυτή του ανοσοφθορισμού η οποία συνίσταται στη σύνδεση ειδικών αντιορρών με την φθορίζουσα χημική ουσία ισοθιακυανική φλουροσκεΐνη. Ακολουθεί στη συνέχεια σύνδεση των αντιορρών με το αντιγόνο και σχηματισμός σταθερών ανοσοσυμπλεγμάτων, ορατών λόγω του παραγόμενου

φθορισμού, σε μικροσκόπιο υπεριώδους φωτός που είναι απαραίτητο για την συγκεκριμένη μέθοδο.

Οι επόμενες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν αργότερα και εφαρμόζονται κατά κύριο λόγο σήμερα, είναι οι ανοσοενζυμικές. Βασίζονται τόσο στην ανοσοδραστικότητα των αντισωμάτων, όσο και στην ιδιότητα ορισμένων ενζύμων να αντιδρούν με αχρωμάτιστα υποστρώματα χρωμογόνων ενέσεων με τελικό επακόλουθο τον σχηματισμό ενός χρωματισμένου τελικού προϊόντος. Τα ένζυμα αυτά εφαρμόζονται στους ιστούς αφού προηγουμένως έχει επιτελεσθεί η σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος και η εφαρμογή τους έχει ως αποτέλεσμα τον έντονο χρωματισμό των ανοσοσυμπλεγμάτων, επιτρέποντας την παρατήρηση - εντοπισμό τους με το κοινό μικροσκόπιο.

2.2 Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες

2.2.1 Ki-67

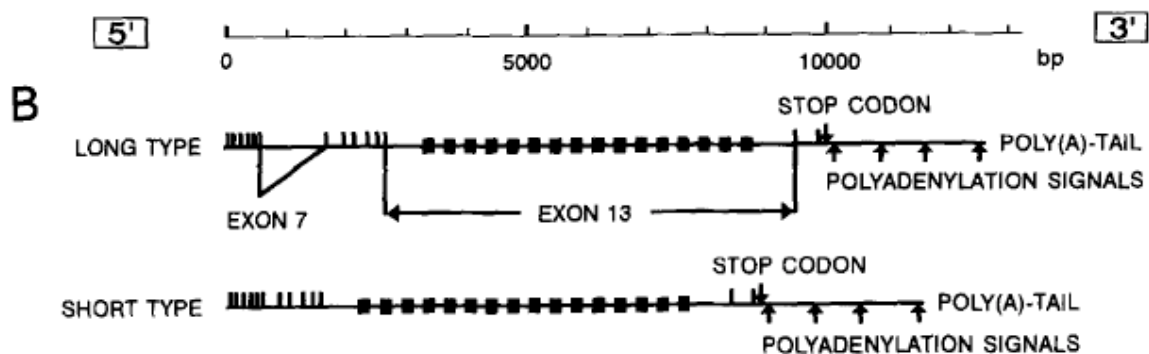
Η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα του επιθηλίου του παχέος εντέρου θεωρείται διαταραχή που δυνητικά τουλάχιστον προδιαθέτει στην έναρξη της νεοπλασματικής διαδικασίας [153] σε συνδυασμό και με άλλες μεταβολές στην φυσιολογική κυτταρική δραστηριότητα όπως π.χ. ελάττωση του ρυθμού απόπτωσης [154]. Από την άλλη πλευρά, ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός αποτελεί στοιχείο που χαρακτηρίζει την ήδη εγκατεστημένη νεοπλασματική εξεργασία όπως έχει επισημανθεί και στο κλασσικό μοντέλο καρκινογένεσης του παχέος εντέρου που προτάθηκε από τους Fearon & Vogelstein [44].

Το αντιγόνο Ki67 αποτελεί δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς εκφράζεται στις φάσεις G1, G2, S και M του κυτταρικού κύκλου, ενώ φαίνεται να ελαττώνεται κατά την ανάφαση και την τελόφαση για να εξαφανιστεί στην G0 (φάση ηρεμίας) [155].

Πρόκειται για μια ογκώδη πρωτεΐνη που έχει απομονωθεί από τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα σε δύο ισομορφές (μακρά και βραχεία) (Σχήμα 10), οι οποίες

κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο το οποίο είναι επίσης τεράστιο (σχεδόν 30000 ζεύγη βάσεων) [156].

Το σημαντικότερο τμήμα του γονιδίου (και της εκφραζόμενης από αυτό πρωτεΐνης) είναι το εκτεταμένο κεντρικό τμήμα του (εξόνιο 13), το οποίο περιέχει 16 διαδοχικές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες (υπεύθυνες για την κωδικοποίηση 120 περίπου αμινοξέων η κάθε μια), οι οποίες είναι σε μεγάλο βαθμό όμοιες. Σε αυτό το τμήμα, εντοπίζονται οι επίτοποι που ανιχνεύονται από τα μονοκλωνικά αντισώματα Ki67 και MIB-1 [156].



Σχήμα 10. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη Ki-67 (CDNA). Απεικόνιση των δύο μορφών της. Μακρά μορφή (κέντρο), Βραχεία μορφή (κάτω). Η οριζόντια γραμμή (πάνω) αντιπροσωπεύει την κατεύθυνση της μεταγραφής από το 5' άκρο προς το 3' άκρο. Τα μικρά μαύρα τετραγωνάκια αντιπροσωπεύουν τις 16 επαναλαμβανόμενες ακολουθίες στο τεράστιο κεντρικό τμήμα του μορίου (exon 13) οι οποίες κωδικοποιούν τον επίτοπο που αναγνωρίζεται από το Ki-67. (Από: Schlfiter C, Duchrow M, Wohlenberg C *et al.* The Cell proliferation – associated Antigen of Antibody Ki-67. *J Cell Biol.* 1993;123:513-522)

Η πρωτεΐνη Ki67, εμφανίζει μια πολύπλοκη και συνεχώς μεταβαλλόμενη εντόπιση στον πυρήνα του κυττάρου κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (κυρίως μεταξύ πυρηνίσκου και περιχρωματοσωμικού στρώματος) [157]. Η λειτουργία της δεν είναι σαφής, ίσως όμως συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενώ πιθανολογείται κάποιος ρόλος της στην παραγωγή των ριβοσωμάτων (λόγω της συχνής εντόπισης της στον πυρηνίσκο) [157].

Αν και ανιχνεύεται με σχετικά απλές ανοσοϊστοχημικές (μονοκλωνικό αντίσωμα) μεθόδους [155, 158, 159], θα πρέπει πάντως να ληφθεί υπόψιν ότι αυτό που καταγράφεται με την έκφραση του Ki67 είναι ο αριθμός των ενεργών κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο, όχι όμως ο απαιτούμενος χρόνος για την ολοκλήρωση του κύκλου, δηλαδή ο ρυθμός [158, 160, 161]. Ως εκ τούτου είναι δυνατόν να ανιχνεύεται με την αυξημένη χρώση του Ki67, ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων ενός νεοπλασματος με βραδύ πολλαπλασιασμό και με αργό κυτταρικό κύκλο (και επομένως με πολλά κύτταρα εντός αυτού), ενώ αντίθετα ένα άλλο νεόπλασμα με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και σύντομο κυτταρικό κύκλο (επομένως λίγα κύτταρα εντός αυτού), μπορεί να εμφανίζει πολύ χαμηλό ποσοστό ανοσοϊστοχημική χρώσης του Ki67 [160].

Έχει επίσης παρατηρηθεί έκφραση της Ki67 πρωτεΐνης στα κύτταρα που βρίσκονται εντός κυτταρικού κύκλου (non cycling cells), συνήθως στα κομβικά σημεία G1S και G2M [161]. Επομένως ο συνυπολογισμός αυτών των αδρανών κυττάρων στην μετρούμενη ανοσοϊστοχημικά έκφραση του Ki67 οπωσδήποτε επηρεάζει την αξιοπιστία της μεθόδου ως προς την απεικόνιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ωστόσο η ευρεία χρήση της ερμηνεύεται από την απλότητα και την ευκολία εφαρμογής της στην καθημερινή πρακτική των περισσότερων εργαστηρίων (σε αντίθεση με τις πολυπλοκότερες μεθόδους προσδιορισμού, όπως αυτή του Ki67 mRNA [162]).

Το Ki67 έχει μελετηθεί εκτεταμένα κατά την τελευταία 15ετία ως προγνωστικός δείκτης σε διάφορους τύπους καρκίνων, με αποτελέσματα που παρουσιάζουν ευρύτατη διακύμανση, ανάλογα με την συγκεκριμένη νόσο. Πέραν της προγνωστικής αξίας έχουν προταθεί διάφορες διαγνωστικές εφαρμογές του Ki67 σε διάφορους τύπους κακοηθών νεοπλασμάτων αλλά και προκαρκινωματοδών καταστάσεων. Ο προσδιορισμός της έκφρασης του Ki67 σε αυτές τις κατηγορίες μπορεί να βοηθήσει σε αμφίβολες περιπτώσεις στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ κακοήθειας/καλοήθειας (π.χ. σε καρκινώματα του δέρματος) ή μεταξύ σοβαρής δυσπλασίας και καλοήθους φλεγμονώδους ατυπίας (σε περιστατικά ελκώδους κολίτιδας) ή ακόμη μεταξύ σοβαρής δυσπλασίας τραχήλου μήτρας (CIN) και καλοήθους ατροφίας (μετεμμηνοπαυσιακής) [157].

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει επιβεβαιώσει την συχνή παρουσία του Ki67 στα νεοπλασμάτα του παχέος εντέρου και έχει γίνει προσπάθεια συσχέτισμού της έκφρασης του με κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου (στάδιο, επιθετικότητα, κλινική εξέλιξη και πρόγνωση) με αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα [160, 163-165]. Σε μια ανασκόπηση οκτώ εργασιών διαπιστωθεί ότι σε μόνο μια παρατηρείται συσχέτιση της έκφρασης του Ki67 με την πρόγνωση και σε μια άλλη, με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής [164]. Σε αντιδιαστολή με αυτά τα ευρήματα έχει τεκμηριωθεί δυσμενέστερη πρόγνωση σε άλλες κακοήθεις νεοπλασίες με αυξημένα επίπεδα Ki67 (και επομένως αυξημένη κυτταρική δραστηριότητα), όπως περιγράφεται σε μια άλλη σχετική ανασκόπηση [157].

Οι περισσότερες μελέτες δεν κατέδειξαν συσχέτιση του Ki67 με την πρόγνωση του ορθοκολικού καρκίνου, τουλάχιστον σε ότι αφορά την έκφραση του δείκτη στον πρωτοπαθή όγκο. Αντίθετα, η αυξημένη έκφραση του Ki67 σε λεμφαδενικές ή ηπατικές μεταστάσεις φαίνεται να αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου σε αυτά τα προχωρημένα στάδια C και D [166-168].

Πιθανή ερμηνεία του ανωτέρω φαινομένου αποτελεί το γεγονός ότι ο πρωτοπαθής καρκινικός όγκος αποτελεί μια ετερογενή και ανομοιογενή ομάδα στελεχών καρκινικών κυττάρων, εκ των οποίων επικρατούν κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού τα πλέον επιθετικά, τα οποία είναι και εκείνα που κυρίως συνιστούν τις λεμφαδενικές και ηπατικές μεταστάσεις επομένως είναι αναμενόμενο να παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του Ki67 [168].

Ορισμένοι συγγραφείς έχουν εντοπίσει διαφορές στην κυτταρική δραστηριότητα του βλεννογόνου μεταξύ του δεξιού και αριστερού κόλου, σε άτομα ομάδων υψηλού κινδύνου για καρκίνο παχέος εντέρου [169] ή και σε ασθενείς [153] αν και τα αποτελέσματα τους εμφανίζονται εν μέρει αλληλοσυγκρουόμενα.

Τέλος σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη, στην οποία έγινε σύγκριση μεταξύ νεοπλασμάτων κόλου και ορθού, αν και δεν διαπιστώθηκε διαφορά στην έκφραση του Ki67 μεταξύ των δύο ομάδων, ωστόσο ανιχνεύθηκε προγνωστική σημασία του συγκεκριμένου δείκτη, μόνο για την ομάδα του ορθού [170].

2.2.2 Bcl-2

Το Bcl-2 είναι μέλος της οικογένειας ογκοπρωτεϊνών με τουλάχιστον 15 μέλη, εκ των οποίων άλλα επάγουν και άλλα (όπως το Bcl-2) αναστέλλουν την κυτταρική απόπτωση [171]. Πρόκειται για ένα πρωτο-ογκογονίδιο που βρίσκεται στο χρωματόσωμα 8 και εντοπίστηκε αρχικά στις μελέτες της χρωμοσωματικής μετατόπισης t(14:18), η οποία παρατηρείται στα θυλακιώδη λεμφώματα και στην λευχαιμία των β-κυττάρων [172].

Το ανώτερο ογκογονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη [172, 173], της οποίας η λειτουργία συνίσταται στην αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, επιμηκύνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την επιβίωση των κυττάρων [173, 174]. Ως εκ τούτου η έκφραση στους ανθρώπινους φυσιολογικούς ιστούς εκφράζεται σε αυτούς των οποίων τα κύτταρα έχουν μακρά επιβίωση π.χ. οι νευρώνες, τα κύτταρα των εντερικών κρυπτών και ορισμένα από τα β-λεμφοκύτταρα [175].

Πέραν τούτου το Bcl-2 έχει παρατηρηθεί σε κακοήγη νεοπλασμάτα, εκτός του αιμοποιητικού συστήματος όπως: πνεύμονος, μαστού, ωοθηκών, θυρεοειδούς, στομάχου, προστάτου, αλλά και νευρικού ιστού [176-181]. Σε μερικά από τα πιο πάνω νεοπλασμάτα η έκφραση του Bcl-2 φαίνεται να συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση (πνεύμονος, μαστού, θυρεοειδούς) [176, 178].

Το Bcl-2 εκφράζεται από το φυσιολογικό επιθήλιο του παχέος εντέρου και ειδικότερα από το κατώτερο τμήμα των κρυπτών του κόλου όπου θεωρείται ότι προστατεύει τα κύτταρα τους από την απόπτωση [175, 182-184].

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου το Bcl-2 φαίνεται να συμμετέχει από τα αρχικά στάδια στην καρκινογένεση σύμφωνα με την ακολουθία αδένωμα – καρκίνωμα. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του (συνεπεία γενετικής μεταβολής) οδηγεί σε συσσώρευση κυττάρων μακράς επιβίωσης γεγονός που προδιαθέτει στα άλλα γενετικά συμβάματα της ακολουθίας αδένωμα – καρκίνωμα [185, 186]. Πάντως η επίδραση του φαίνεται να συνεχίζεται και κατά την πρόοδο της νεοπλασίας [185] και γενικότερα εντάσσεται προφανώς μέσα στα πλαίσια της διαταραχής του φυσιολογικού ισοζυγίου μεταξύ κυτταρικού

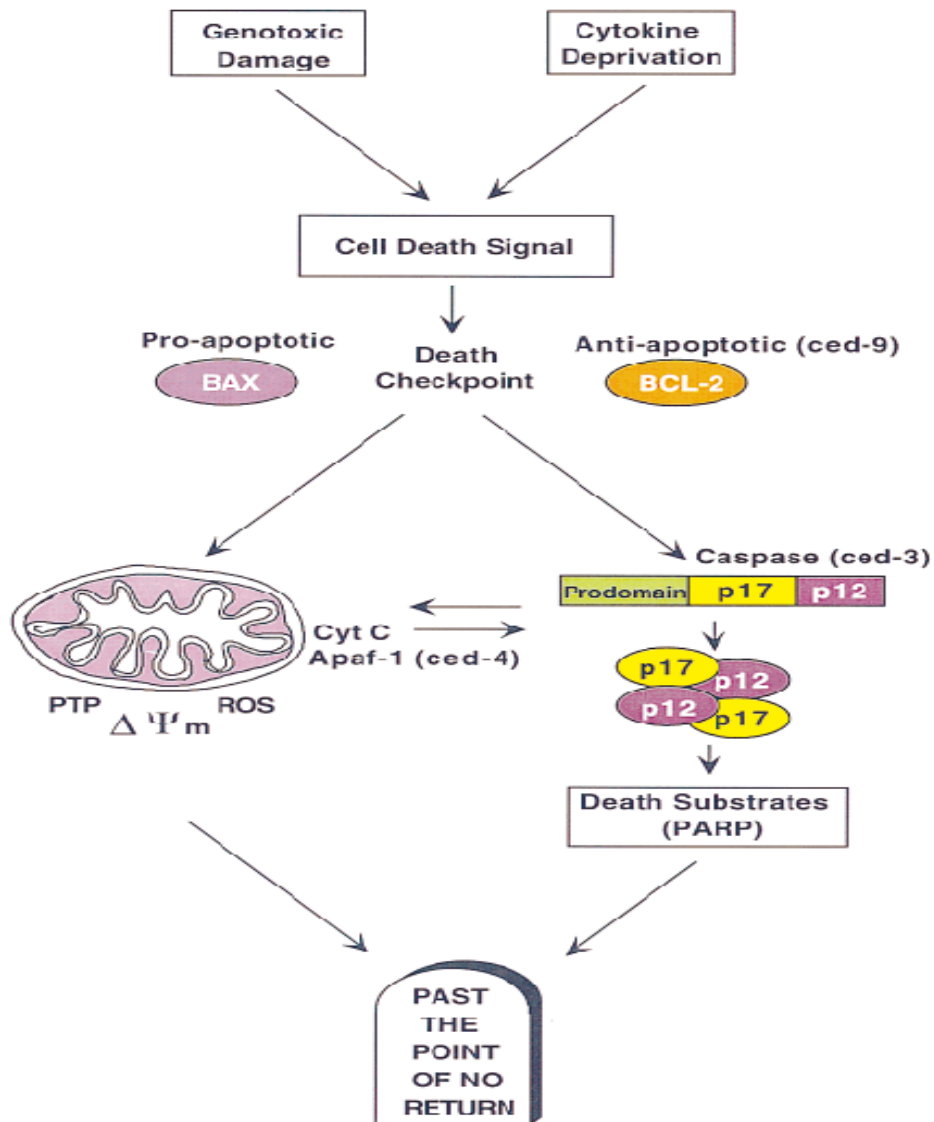
πολλαπλασιασμού και απόπτωσης στο επιθήλιο του παχέος εντέρου η οποία παρατηρείται στην καρκινογένεση [174].

Αυξημένη έκφραση του παρατηρείται στα περισσότερα αδενώματα του παχέος εντέρου [182, 183, 185, 187], όχι όμως και στους μη νεοπλασματικούς πολύποδες [183].

Τα αδενοκαρκινώματα εμφανίζουν αυξημένη μεν έκφραση Bcl-2 σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο η οποία όμως είναι μικρότερου μεγέθους συγκρινόμενη με την έκφραση του Bcl-2 στα αδενώματα [182, 183, 185, 187, 188].

Επομένως η έκφραση του Bcl-2 φαίνεται να ελαττώνεται βαθμιαία κατά την εξέλιξη της ακολουθίας αδένωμα – καρκίνωμα. Αυτό σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη προοδευτική αύξηση του ρυθμού απόπτωσης κατά την διάρκεια της ίδιας διαδικασίας [189], οδηγεί στη λογικοφανή εκδοχή της πιθανής συσχέτισης του Bcl-2 με τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και της εν συνεχεία ελαττωμένης συμμετοχής του στα προχωρημένα στάδια [157, 185].

Ωστόσο η αντίστροφη σχέση μεταξύ Bcl-2 και απόπτωσης (δηλ. αύξηση της απόπτωσης με ελάττωση του Bcl-2), δεν επιβεβαιώνεται πάντοτε από τις μελέτες [190, 191], γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη πολλών άλλων ρυθμιστών της απόπτωσης από τα οποία αρκετά είναι μέλη της οικογένειας του Bcl-2 όπως έχει ήδη αναφερθεί. Συγκεκριμένα η αντι αποπτωτική Bcl-X_L πρωτεΐνη και οι προάγουσες την απόπτωση πρωτεΐνες Bax και Bak φαίνεται να διαδραματίζουν αρκετά σημαντικό ρόλο στη διάρκεια της νεοπλασματικής διαδικασίας του καρκίνου του παχέος εντέρου [171, 192] (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Μοντέλο κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) στα θηλαστικά. Το σήμα του κυτταρικού θανάτου προερχόμενο από διάφορα αίτια (πάνω μέρος) φθάνει σε ένα κομβικό σημείο ελέγχου (death check point) στο οποίο θεωρείται κρίσιμη η σχέση ανάμεσα στα προαποπτωτικά μόρια (Bcl-2). Η περαιτέρω εξέλιξη της αποπτωτικής διαδικασίας γίνεται μέσω δύο διαφορετικών αλλά αλληλοεπηρεαζόμενων μηχανισμών (κάτω μέρος) α) της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και β) της ενεργοποίησης της κασπάσης (Caspase)

(Από: Gross A *et al.* Genes Dev 1999;13:1899-1911)

Επίσης στη ρύθμιση της απόπτωσης συμμετέχουν και άλλα γονίδια, (εκτός της οικογένειας του Bcl-2), όπως το p53 του οποίου η έκφραση φαίνεται να εξελίσσεται αντίστροφα από εκείνη του Bcl-2, δηλαδή αυξάνεται κατά την πρόοδο της νεοπλασματικής ακολουθίας αδένωμα – καρκίνου [187, 188, 193, 194].

Πάντως και η ίδια η αύξηση του ρυθμού απόπτωσης (ανεξάρτητα από τον βαθμό συμμετοχής του Bcl-2 σε αυτήν) χρήζει προσεκτικής ερμηνείας: Πιθανώς κατ' αρχήν να οφείλεται στη προσπάθεια του οργανισμού να εξαλείψει τα κύτταρα που έχουν βλάβη στο DNA τους, αλλά στη συνέχεια καθώς η νεοπλασματική εξεργασία εξελίσσεται, παρατηρείται προοδευτική επικράτηση των κυττάρων που ανθίσταται στη προγραμματισμένη απόπτωση και συνεχίζουν να επιβιώνουν με μια διαδικασία «φυσικής επιλογής» [184].

Το Bcl-2 θεωρείται για τους προαναφερθέντες λόγους ότι συμβάλλει στη νεοπλασματική ανάπτυξη με ρυθμό σαφώς βραδύτερο εκείνου που προκαλείται από άλλα ογκογονίδια που επιδρούν επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ενώ το Bcl-2 επηρεάζει την απόπτωση) [173, 174, 185].

Σε κάθε περίπτωση, φαίνεται ότι αποτελεί μέρος της ευρύτερης διαταραχής του φυσιολογικού ισοζυγίου ανάμεσα στο πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, η οποία παρατηρείται στο επιθήλιο του παχέος εντέρου και οδηγεί τελικά στη καρκινογένεση [174, 194].

Όσον αφορά την συσχέτιση της έκφρασης του Bcl-2 με την πρόγνωση του καρκίνου του παχέος αντέρου υπάρχουν αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα από διάφορες μελέτες [188, 190, 191]. Ορισμένες εργασίες με μεγάλο αριθμό ασθενών δεν κατέληξαν σε οποιαδήποτε σχέση Bcl-2 και πρόγνωσης ή απάντησης στη χημειοθεραπεία [182, 195]. Άλλοι ερευνητές ανίχνευσαν συσχέτιση της έκφρασης του Bcl-2 με καλύτερη πρόγνωση [186, 188, 195-197]. Επιπλέον ο συνδυασμός θετικής έκφρασης Bcl-2 με αρνητική έκφραση του p53 φαίνεται να συνοδεύεται από ευνοϊκή έκβαση της νόσου [186, 198], ενώ ο αντίθετος συνδυασμός (Bcl-2 αρνητικό με p53 θετικό) φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο, τουλάχιστον για το αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου, σύμφωνα με μια μελέτη η οποία

διαπίστωσε επίσης επιλεκτική ευνοϊκή προγνωστική επίπτωση του Bcl-2 σε όγκους του αριστερού τμήματος [199].

Περαιτέρω μελέτες έχουν καταδείξει την σημασία του συμπλέγματος Bcl-2 /Bax, όπου Bax είναι μια πρωτεΐνη που προάγει την απόπτωση, έχει δηλαδή αντίθετη λειτουργία με το Bcl-2. Έχει υποστηριχθεί ότι ο συνδυασμός υπερέκφρασης του Bcl-2 και ελαττωμένης έκφρασης του Bax επιβαρύνουν την πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου [200].

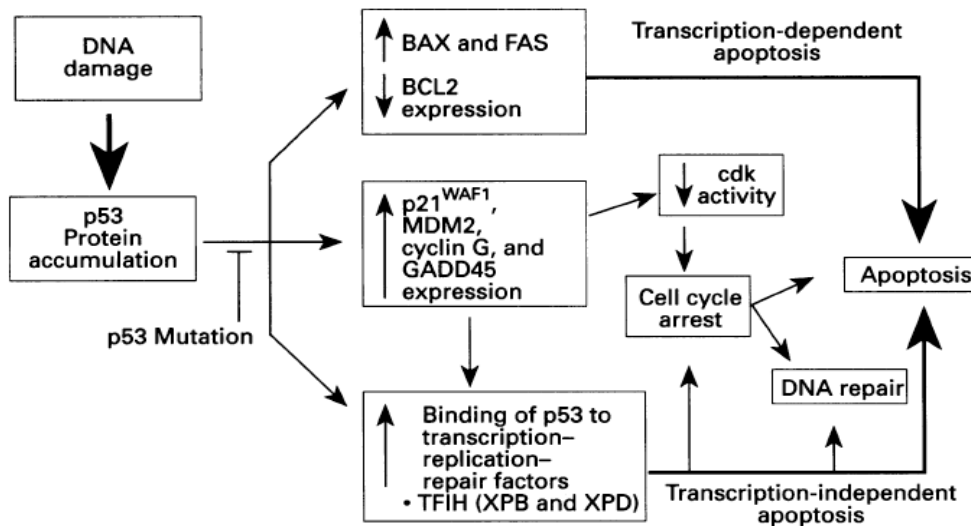
Πάντως η όποια συσχέτιση του Bcl-2 με καλή πρόγνωση, αν και φαίνεται παράδοξη εφ' όσον η δράση του ως αναστολέας της απόπτωσης οδηγεί λογικά σε παράταση ζωής των κυττάρων (επομένως και των καρκινικών) πιθανόν να ερμηνεύεται από την ενδεχόμενη εμπλοκή του σε άλλες λειτουργίες όπως η αποχώρηση από τον κυτταρικό κύκλο και η αναστολή της ανάπτυξης [201, 202].

Όσον αφορά τυχόν διαφορές μεταξύ δεξιού – αριστερού τμήματος του παχέος εντέρου έχει διαπιστωθεί μικρότερη αποπτωτική δραστηριότητα στο δεξιό κόλο, αποδιδόμενη μάλλον στη χαμηλή έκφραση του προ-αποπτωτικού ομολόγου Bcl-2 Bak [203].

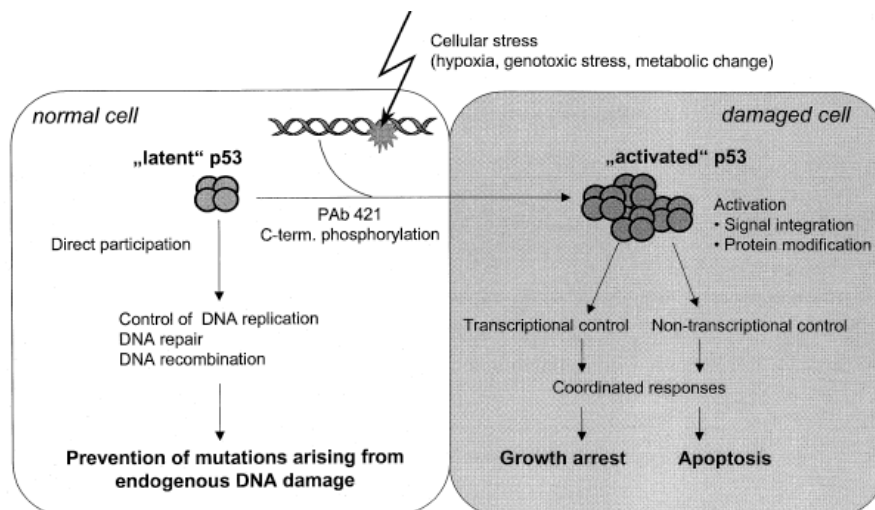
2.2.3 P-53

Το P-53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και στην αντιγραφή του DNA [204, 205] και συμβάλλει στη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας (φύλακας του γονιδιώματος) [206], επάγοντας την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική απόπτωση στη περίπτωση εμφανούς βλάβης στο DNA του κυττάρου [206] (Σχήμα 12).

Πέραν της παρεμβατικής αντίδρασης του στην αντιμετώπιση διαφόρων ήδη εκδηλωθέντων σοβαρών βλαβών που προκαλούν την άμεση ενεργοποίησή του, φαίνεται επίσης ότι το p-53 ασκεί επιπλέον και μια προληπτική – προστατευτική δράση και όταν βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας, ελέγχοντας και διορθώνοντας μικροσφάλματα του DNA [207] (Σχήμα 13).



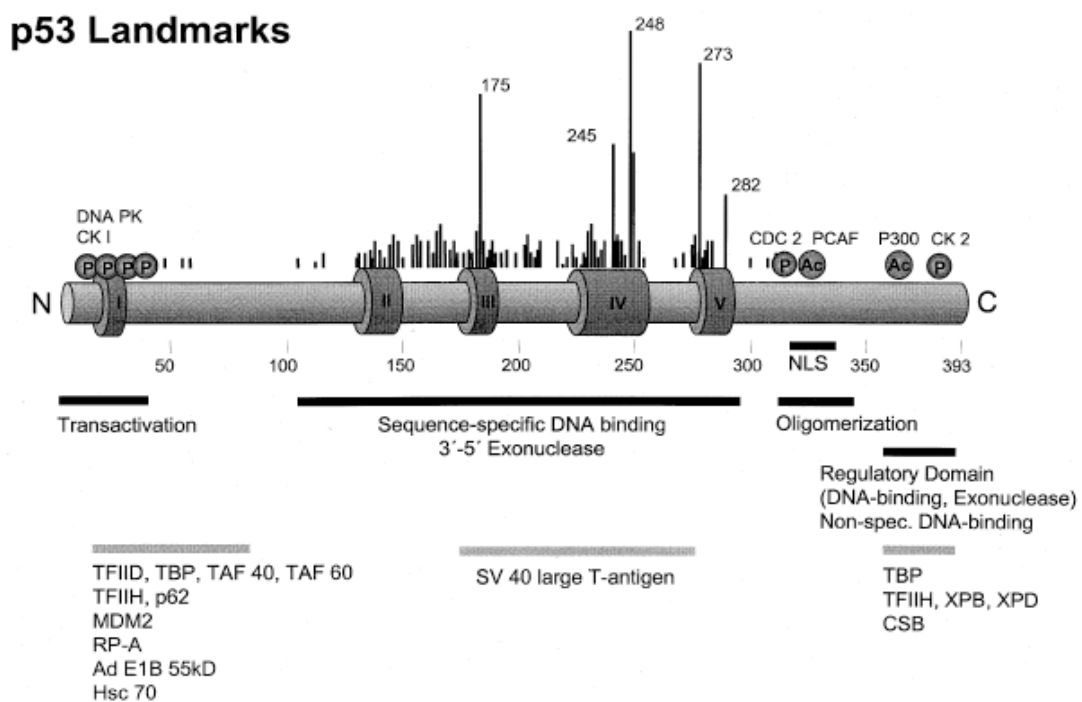
Σχήμα 12. Ενεργοποίηση του ελεγχόμενου από το p53 μηχανισμού σε βλάβη του DNA. Συσσώρευση της p53 πρωτεΐνης επί βλάβης του DNA, έχει ως επακόλουθα α) Μεταβολές στην έκφραση άλλων γονιδίων (όπως τα ρυθμίζοντα την απόπτωση Bcl-2 & Bax) β) Αλληλεπίδραση με άλλες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες (όπως MDM2) γ) Σύνδεση με ειδικούς παράγοντες επισκευής λαθών στην μεταγραφή. Όλες οι ανωτέρω αντιδράσεις καταλήγουν είτε σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου με σκοπό την αποκατάσταση της βλάβης του DNA, είτε σε απόπτωση (κυτταρικός θάνατος). (Από: Harris C, p53 Tumor suppressor gene. Environ Health Persp. 1996;Supl.3:435-439)



Σχήμα 13. Διπλός ρόλος του p53 ως φύλακας του γονιδιώματος. Προτεινόμενο δυαδικό μοντέλο προστατευτικής λειτουργίας του p53. α) Συμμετοχή του μη ενεργοποιημένου p53 (σε φυσιολογικό κύτταρο) στην πρόληψη μεταλλάξεων από ενδογενές βλάβες του DNA (Αριστερά). β) Ενεργοποίηση του p53 σε κύτταρο με βλάβη του DNA από εξωγενή αίτια οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου η και σε απόπτωση (Δεξιά) (Από: Alberchtsen *et al.* Oncogene 1999; 18:7706)

Θεωρείται το συχνότερα υφιστάμενο μεταλλαγές στους ανθρώπινους συμπαγείς όγκους [208], π.χ. σε καρκίνους του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου [209], κ.α. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης τόσο της p-53 πρωτεΐνης όσο και του mRNA εντοπίζονται σε αυτές τις περιπτώσεις [210].

Αδρανοποίηση του p-53 γονιδίου συνεπεία αλληλικής απώλειας ή άλλης γενετικής βλάβης (συνήθως μεταλλαγής) του γονιδίου, οδηγεί σε γενετική αστάθεια και επιβίωση των κυττάρων που έχουν βλάβη στο DNA τους [211]. Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν συγκεκριμένο λειτουργικό τμήμα του p-53, που βρίσκεται στο κεντρικό τομέα του μορίου και είναι ειδικά επιφορτισμένο με σύνδεση στο DNA (DNA specific binding domain) [204, 205, 207, 211] (Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Απεικόνιση του μορίου του p53. Οι δακτύλιοι με τα λατινικά γράμματα (I-V) αντιπροσωπεύουν τις συμπυκνωμένες περιοχές του p53. Οι οριζόντιες γραμμές, κάτω από το μόριο καταδεικνύουν τα αντίστοιχα λειτουργικά τμήματα (domains) του p53 απευθύνουνα για τις διάφορες βιολογικές λειτουργίες). (Από: Albrechtsen *et al.* Oncogene 1999;187706-7717).

Στο επίπεδο της παραγόμενης πρωτεΐνης, ενώ η παραγόμενη από το φυσιολογικό p-53 έχει μικρό χρόνο ημιζωής και δύσκολα ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά, η προερχόμενη από το μεταλλαγμένο γονίδιο έχει αυξημένο χρόνο ημιζωής και έτσι ανιχνεύεται εύκολα [208, 212].

Μεταλλάξεις του p-53 παρατηρούνται περίπου στο 85% των καρκίνων παχέος εντέρου [184, 213] (αν και άλλοι αναφέρουν σχετικά χαμηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων p-53 της τάξης του 50-70%) [214, 215], όπου πιστεύεται ότι το p-53 εμπλέκεται στην καρκινογένεση εκείνων των όγκων που ακολουθούν το μοντέλο της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN) με απώλεια ετεροζυγώτητος, (εμφανίζοντας την ακολουθία αδενώματος – καρκινώματος) [44, 216]. Οι όγκοι αυτοί εντοπίζονται κυρίως στο αριστερό τμήμα του εντέρου (περιφερικότερα της σπληνικής καμπής) [217] και θεωρείται ότι είναι χειρότερης πρόγνωσης συγκρινόμενη με αυτούς του δεξιού τμήματος που συνήθως ακολουθούν διαφορετικό μοντέλο καρκινογένεσης (αστάθεια DNA – μικροδορυφορική αστάθεια MSI) [218-220].

Οι γενετικές αυτές μεταβολές του p-53 οδηγούν όπως έχουμε αναφέρει στη παραγωγή μεταλλαγμένων p-53 πρωτεϊνών με επιμηκυμένο χρόνο υποδιπλασιασμού (ημιζωής) οι οποίες συσσωρευόμενες ανιχνεύονται εύκολα με ανοσοϊστοχημική μέθοδο [212], που αποτελεί και τον ένα τρόπο προσδιορισμού της μεταβολής του p-53. Μια άλλη τεχνική προσδιορισμού του p-53 είναι η ανάλυση του DNA η οποία ανιχνεύει τις μεταλλάξεις του γονιδίου [204].

Αν και η ανοσοϊστοχημική μέθοδος έχει ευρύτητα χρησιμοποιηθεί σαν έμμεσος δείκτης των γονιδιακών μεταβολών του p-53, στη πραγματικότητα το ποσοστό συσχέτισης μεταξύ των δύο παραμέτρων (μετάλλαξη σε σχέση με ανοσοϊστοχημική χρώση) κυμαίνεται περίπου στο 70% (μερικές μεταλλάξεις δεν συνοδεύονται από υπερέκφραση πρωτεΐνης ενώ υπάρχουν και ψευδώς θετικές χρώσεις) [204, 212].

Από την άλλη πλευρά η προγνωστική σημασία της ανάλυσης του DNA είναι συζητήσιμη, καθώς έχουν παρατηρηθεί ορισμένες μεταλλαγές του p-53 γονιδίου που δεν επηρεάζουν αρνητικά την εξέλιξη της νόσου [221]. Αντίθετα άλλες μεταλλαγές σε συγκεκριμένη περιοχή του μορίου φαίνεται να συσχετίζονται με κακή πρόγνωση [222].

Πάρα τους τεχνικούς περιορισμούς έχει γίνει ευρύτατη μελέτη του ρόλου του p-53 στον καρκίνο του παχέος εντέρου και έχει επιχειρηθεί η συσχέτιση του με την πρόγνωση της νόσου από αρκετούς συγγραφείς, με αντικρουόμενα αποτελέσματα όπως επισημαίνουν οι Graziano & Cascin σε μία σχετικά πρόσφατη εκτεταμένη ανασκόπηση τους [222]. Από επτά αναφερόμενες πρόσφατες (μετά το 1999) αναδρομικές εργασίες οι τέσσερις δεν εμφανίζουν ανεξάρτητο προγνωστικό ρόλο είτε για την υπερέκφραση της p-53 πρωτεΐνης είτε για την γονιδιακή μεταβολή του (Σε ασθενείς με νόσο χωρίς λεμφαδένες και επέκταση – Dukes B) [223-226].

Ένα ενδιαφέρον στοιχείο της ανασκόπησης είναι ότι και οι τρεις αναφερόμενες μελέτες με θετικά ως προς τον προγνωστικό ρόλο του p-53 αποτελέσματα [227-229], εμφανίζουν την ανωτέρω συσχέτιση ανιχνεύοντας την υπερέκφραση του p-53 με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Στις δύο από τις τρεις αυτές θετικές εργασίες όπου χρησιμοποιείται παράλληλα και η μέθοδος της μοριακής ανάλυσης του DNA για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του p-53 [228, 229], δεν παρατηρείται συσχέτιση με την πρόγνωση με αυτή τη μέθοδο. Συγκριτικά αναφέρουμε ότι από τις τέσσερις εργασίες με αρνητικά αποτελέσματα οι τρεις χρησιμοποίησαν την ανοσοϊστοχημική μέθοδο [223, 224, 226] και η μία την μέθοδο μοριακής ανάλυσης DNA [225].

Επίσης σε μια αναφερόμενη στην ανασκόπηση συγκεντρωτική ανάλυση (pooled analysis) από τον Petersen [230], που περιέλαβε στοιχεία από 28 προγενέστερες δημοσιευμένες εργασίες μέχρι το 1999 κατέληξε σε αρνητικά συμπεράσματα για το προγνωστικό ρόλο του p-53 [230].

Ενώ στο ζήτημα της προγνωστικής σημασίας του p-53 υπάρχει διχογνωμία, τα δεδομένα είναι σαφέστερα σε ό,τι αφορά τη σχέση της έκφρασης του συγκεκριμένου δείκτη με την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία [231-234]. Η υπερέκφραση του p-53 φαίνεται να συνδυάζεται γενικώς με χειρότερα αποτελέσματα τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία [231, 232, 234], ενώ ορισμένοι αναφέρουν την συσχέτιση της έκφρασης του p-53 με συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα [231, 233].

Σε ό,τι αφορά την πιθανή συσχέτιση του p-53 με το ρυθμό της κυτταρικής απόπτωσης (ο οποίος αυξάνεται κατά την εξέλιξη της νεοπλασματικής εξεργασίας) παρά το ότι έχει σχετικά εκτεταμένα ερευνηθεί δεν φαίνεται να υπάρχουν σαφή συμπεράσματα. Ορισμένοι διαπίστωσαν συνδυασμό αυξημένης έκφρασης p-53 με χαμηλό ρυθμό κυτταρικής απόπτωσης [187, 191], όμως τα ευρήματα δεν επιβεβαιώνονται από αρκετούς άλλους [186, 190, 194]. Πάντως αρνητική έκφραση του p-53 σε συνδυασμό με αυξημένη έκφραση του αντι-αποπτωτικού δείκτη Bcl-2 φαίνεται να συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση σε ορισμένες μελέτες [198], ενώ αντίθετα αυξημένη έκφραση του p-53 με αρνητική έκφραση Bcl-2, παρατηρηθείσες στο αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου συσχετίστηκαν με ιδιαίτερα αρνητική πρόγνωση [199].

Επομένως δεν μπορεί να υποστηριχθεί με ασφάλεια ό μείζον ρόλος μόνο του p-53 στη συγκεκριμένη περίπτωση, δηλαδή σαν αναστολέα της κυτταρικής απόπτωσης κατά την εξέλιξη της νεοπλασίας του παχέος εντέρου [184]. Πέραν της προγνωστικής σημασίας αλλά και σε συσχέτιση με αυτή, έχει επίσης μελετηθεί (σε μικρότερη πάντως έκταση) και η διαφορά στην εμφάνιση υπερέκφρασης ή μεταλλάξεων του p-53 μεταξύ δεξιού και αριστερού τμήματος του παχέος εντέρου [198, 210, 228, 235, 236]

Έχει παρατηρηθεί ότι όγκοι του δεξιού κόλου εμφανίζουν πολύ μικρότερο ποσοστό μεταβολών του p-53 συγκρινόμενοι με αυτούς του αριστερού τμήματος του εντέρου (αριστερού κόλου και ορθού) [198, 228, 235, 236]. Η διαφορά αυτή η προφανώς οφείλεται στο διαφορετικό μοντέλο καρκινογένεσης που παρατηρείται μεταξύ των δύο τμημάτων του εντέρου [220, 228], όπως έχουμε ήδη αναφέρει. Ορισμένοι συγγραφείς μάλιστα υποστηρίζουν ότι υπάρχει αμοιβαία ασυμβατότητα μεταξύ της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) που παρατηρείται στους όγκους του δεξιού κόλου και της μεταβολής του p-53 που εμφανίζεται κυρίως στο αριστερό κόλον και ορθό.

Ο ρόλος της αδρανοποίησης του p-53 στην τελική εξέλιξη της καρκινογένεσης θεωρείται λοιπόν ιδιαίτερα σημαντικός. Ωστόσο είναι γνωστό ότι στους όγκους που ακολουθούν τον μηχανισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA (MSI), οι παρατηρούμενες μεταλλάξεις του p-53 δεν είναι συχνές [237] (σε αντίθεση με τους όγκους με

χρωμοσωμική αστάθεια που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων του p-53). Γεννάται επομένως το εύλογο ερώτημα με ποιον τρόπο «αναπληρώνεται» η αποφασιστική συμμετοχή των μεταλλάξεων του p-53 στους όγκους με MSI.

Η απάντηση στο πιο πάνω ερώτημα θα πρέπει μάλλον να αναζητηθεί στον γενετικό μηχανισμό της υπερμεθυλίωσης του DNA (CIMP – CPG island methylator – phenotype), ο οποίος είναι συχνότατος στους όγκους με δορυφορική αστάθεια (MSI) αφού μέσω αυτού επέρχεται η αρχική αδρανοποίηση των γονιδίων MMR (ιδιαίτερα του MLH1) [238, 239], στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σποραδικού καρκίνου που ακολουθούν την οδό της αστάθειας του DNA. Φαίνεται λοιπόν ότι «στόχο» για τον μηχανισμό της υπερμεθυλίωσης δεν αποτελούν μόνο τα γονίδια MMR, η αδρανοποίηση των οποίων πυροδοτεί τη μικροδορυφορική αστάθεια αλλά επίσης και το γονίδιο p-14 (ARF) στο χρωματόσωμα 9q το οποίο στα φυσιολογικά κύτταρα αποτελεί ένα είδος ρυθμιστή της έκφρασης του p-53, σταθεροποιώντας την παραγόμενη πρωτεΐνη p-53 παρεμποδίζοντας την περαιτέρω σύνδεση της με άλλες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες μέσω των οποίων εκδηλώνεται τελικά η δράση της [240]. Η αδρανοποίηση (μέσω υπερμεθυλίωσης) του p-14 έχει σαν αποτέλεσμα την απορρύθμιση του φυσιολογικού μονοπατιού λειτουργίας της παραγόμενης p-53 πρωτεΐνης και την τελική διακοπή της δράσης της που είναι η προστασία του γονιδιώματος. Επομένως κατ' αυτόν τον τρόπο προάγεται η περαιτέρω εξέλιξη της νεοπλασματικής διαδικασίας στους όγκους CIMP(+), χωρίς να απαιτούνται μεταλλάξεις του p-53 [240].

Η διαφορά στην έκφραση μεταβολών p-53 μεταξύ δεξιού και αριστερού κόλου (και ορθού) σε συνδυασμό με την πιθανή προγνωστική σημασία του p-53 (εφόσον αυτή επιβεβαιωθεί με νέες μελέτες) θα συμβάλει ενδεχομένως στον καλύτερο σχεδιασμό της θεραπευτικής αγωγής μετά τη χειρουργική αντιμετώπιση, κυρίως της χημειοθεραπείας και ίσως και της ακτινοθεραπείας ιδιαίτερα σε ασθενείς με σχετικά περιορισμένη νόσο (Σταδίου B κατά Dukes) [228]. Επομένως η περαιτέρω διερεύνηση του θέματος σε συνδυασμό και με άλλους δείκτες ίσως τελικά επιτρέψει την επιλογή της πλέον κατάλληλης θεραπείας για κάθε ασθενή.

3. Τελομερές, Τελομεράση και Ορθοκολικός Καρκίνος

3.1 Τελομερές

3.1.1 Δομή και λειτουργία του τελομερούς

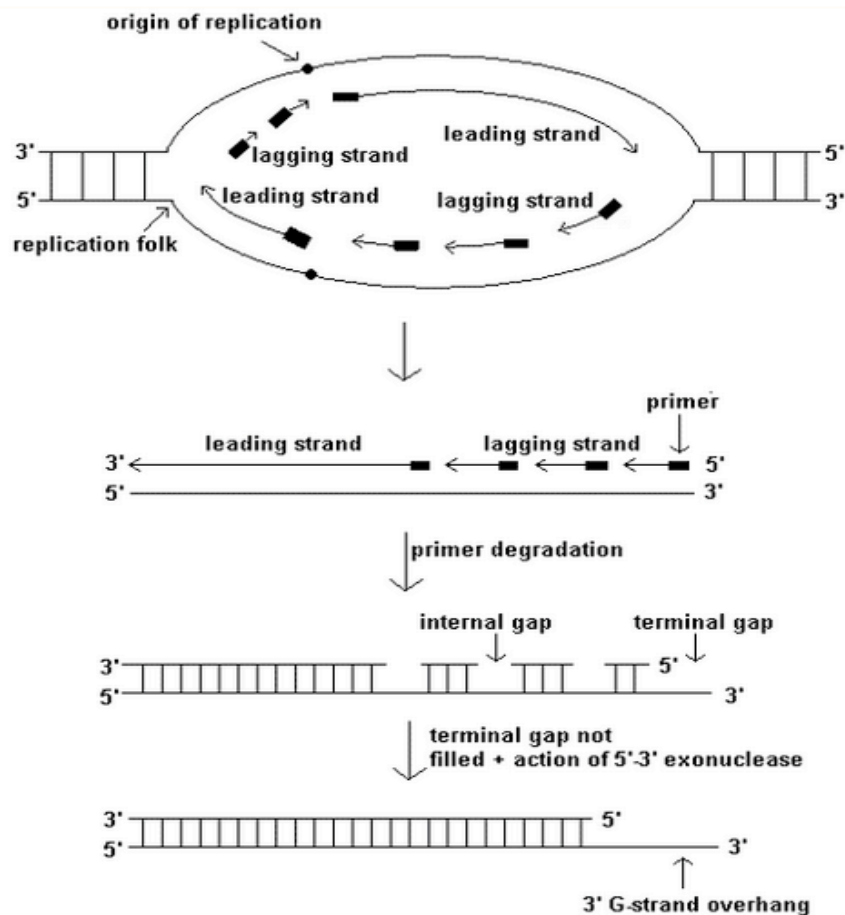
Στη δεκαετία του 30' ο Hermann J. Muller και η Barbara McClintock περιέγραψαν για πρώτη φορά το τελομερές (σύνθετη Ελληνική λέξη από “τέλος” και “μέρος”), το οποίο ήταν μια δομή προστατευτική στο τέλος κάθε χρωματοσώματος. Όταν αυτή η δομή δεν υπάρχει τότε είναι δυνατόν να συμβεί σύντηξη του χρωμοσώματος με αποτέλεσμα θάνατο του κυττάρου. Τέσσερις δεκαετίες αργότερα ο James D. Watson περιέγραψε αυτό που ο ίδιος ονόμασε “πρόβλημα αντιγραφής του τέλους”. Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του DNA, η εξαρτώμενη από το DNA πολυμεράση δεν αντιγράφει πλήρως το τελευταίο 5' άκρο του χρωματοσώματος, αφήνοντας έτσι χωρίς αντιγραφή μια μικρή περιοχή του τελομερούς. Διαπίστωσε δε, ότι χρειαζόταν ένας συμπληρωματικός μηχανισμός για να συμπληρώσει το κενό αυτό διαφορετικά το τελομερές συνεχώς μίκραινε μετά από κάθε αντιγραφή του κυττάρου [241].

Εν τω μεταξύ μέσα στην δεκαετία του '60 ο Hayflick περιέγραψε την βιολογία της γήρανσης. Απέδειξε ότι τα ανθρώπινα διπλοειδικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται μόνο για περιορισμένες φορές σε κυτταρικές καλλιέργειες. Το "Hayflick limit" είναι ο μέγιστος αριθμός πολλαπλασιασμών που μπορεί να επιτύχει ένα κύτταρο σε περιβάλλον in-vitro. Όταν τα κύτταρα φτάσουν αυτό το όριο τυγχάνουν διάφορων μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών που τελικά καταλήγουν σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μια διαδικασία που καλείται κυτταρική γήρανση (cell senescence) [242, 243]. Έτσι στην δεκαετία του '70 ο Ολονίκον σε μια δική του θεωρία "Theory of Marginalotomy", συνέδεσε την κυτταρική γήρανση με το “πρόβλημα της αντιγραφής του τέλους” κάθε χρωματοσώματος, στην οποία η βράχυνση του τελομερούς προτάθηκε σαν ένας εσωτερικός ορολογιακός μηχανισμός γήρανσης. Το 1988 ο Greider και οι συνεργάτες του [241], επιβεβαίωσαν αυτή την θεωρία

όταν παρατήρησαν προοδευτική μείωση του μήκους κάθε τελομερούς σε διαιρούμενα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν in-vitro. Το 1978 η Elizabeth Blackburn ανακάλυψε ότι η κυτταρική δομή του τελομερούς στην *Tetrahymena pyriformis* περιλάμβανε μακρές επαναλήψεις από θυμιδίνη (T) και γουανίνη (G). Το 1984 η ίδια και οι συνεργάτες της απομόνωσαν την τελομεράση, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την διατήρηση αλλά και την αύξηση του μήκους του τελομερούς. Το 1989 ο Gregg ανέφερε την ύπαρξη της ενεργότητας της τελομεράσης σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, η οποία συνείσφερε στην αθανатоποίηση των κυτταρικών σειρών [244]. Στην δεκαετία του '90 η Shay and Harley ανακάλυψαν τελομεράση σε 90 από τους 101 ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς από 12 διαφορετικούς τύπους καρκίνων. Έτσι από τότε ελέγχθηκαν περισσότερα από 2600 διαφορετικά δείγματα καρκινικού ιστού από τα οποία ανευρέθει τελομεράση στο 90% [244]. Προφανώς η τελομεράση έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ογκογένεσης [241].

3.1.2 Τελομερές, προστάτης του τέλους των χρωμοσωμάτων

Τα ανθρώπινα τελομερή αποτελούνται από μακριές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων TTAGGG οι οποίες συνοδεύονται από πολλαπλές πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τα τελομερή. Τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα θα εισέλθουν σε αντιγραφικό γηρασμό μετά από συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών πολλαπλασιασμών. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στο πρόβλημα της αντιγραφής του τέλους (end-replication problem). Σε ένα ή περισσότερα ταυτόχρονα σημεία του αντιγραφόμενου χρωμοσώματος η DNA πολυμεράση αρχίζει με ένα εκκινήτη στο 3' άκρο και τρέχει προς το 5' άκρο του προτύπου χρωμοσώματος δημιουργώντας τον 5' προς 3' κυρίαρχο κλώνο (leading strand) καθώς και τον 3' προς 5' υστερών (δευτερεύων) κλώνο (lagging strand) [243]. Ο κυρίαρχων κλώνος τρέχει προς την αντιγραφική διχάλα, ενώ η σύνθεση του δευτερεύων κλώνου (αποτελούμενη από τα τμήματα Okazaki) ξεκινά από την αντιγραφική διχάλα και τρέχει προς την αντίθετη κατεύθυνση (Σχήμα 15). Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση οι εκκινήτες φθείρονται και δημιουργούνται έτσι διάκενα σε κάθε μεριά της αντιγραφής.



Σχήμα 15. Βράχυνση του τελομερούς κατά την αντιγραφή του DNA. Η φθορά των εκκινητών στον υστερών κλώνο κι η δράση της 5' προς 3' εξονουκλεάσης οδηγεί στη βράχυνση του 5' άκρου του τελομερούς και στη δημιουργία ενός επικρεμμάμενου (προεξέχον δομή) 3' άκρου. (Από: Wai LK, *et al.* MedGenMed. 2004 Jul 26; 6(3):19)

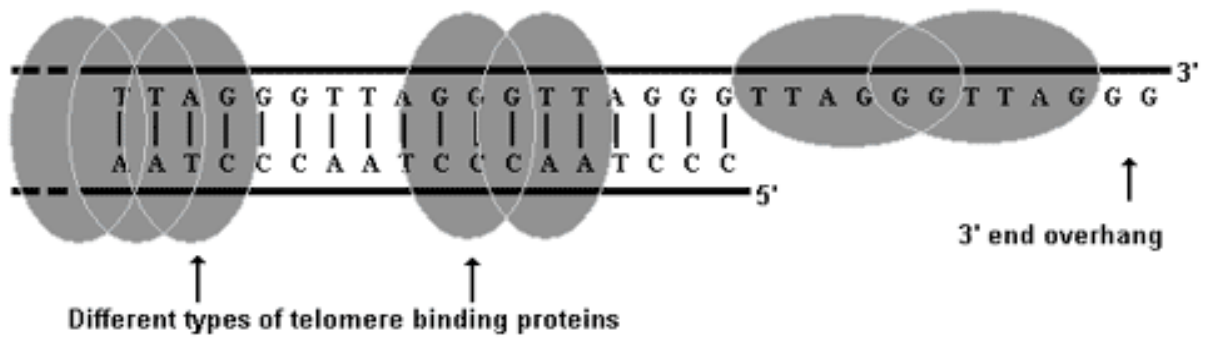
Τα διάκενα του νεοσχηματισθέντος θυγατρικού κλώνου γεμίζουν από την DNA-λιγάση. Εξαιρέση αποτελεί το τελικό κενό (*terminal gap*) δηλαδή το κενό που δημιουργείται από την φθορά του εκκινητή και στους δύο κλώνους, το οποίο δεν γεμίζει. Επιπλέον ο τελικό κενό μεγαλώνει με την δράση της 5' προς 3' εξονουκλεάσης, η οποία τελικά φθείρει 130-210 νουκλεοτίδια. Έτσι το 5' άκρο του τελομερούς βραχύνεται μετά από κάθε διαίρεση [245, 246]. Μετά από συγκεκριμένο αριθμό αντιγραφών το τελομερές φτάνει σε ένα κρίσιμο μήκος (σημείο μαρασμού), στο οποίο σταματά κάθε αντιγραφή κυττάρου, είτε επέρχεται ο θάνατος του κυττάρου (φυσιολογική γήρανση). Αν παρόλα αυτά το κύτταρο καταφέρει να ξεφύγει ή να

αποφύγει αυτό το σημείο μαρασμού, τότε επέρχεται χρωμοσωμική ανωμαλία ή σύντηξη των άκρων του χρωμοσώματος, το οποίο συμβάλλει στο κυτταρικό θάνατο ή στη καρκινογένεση.

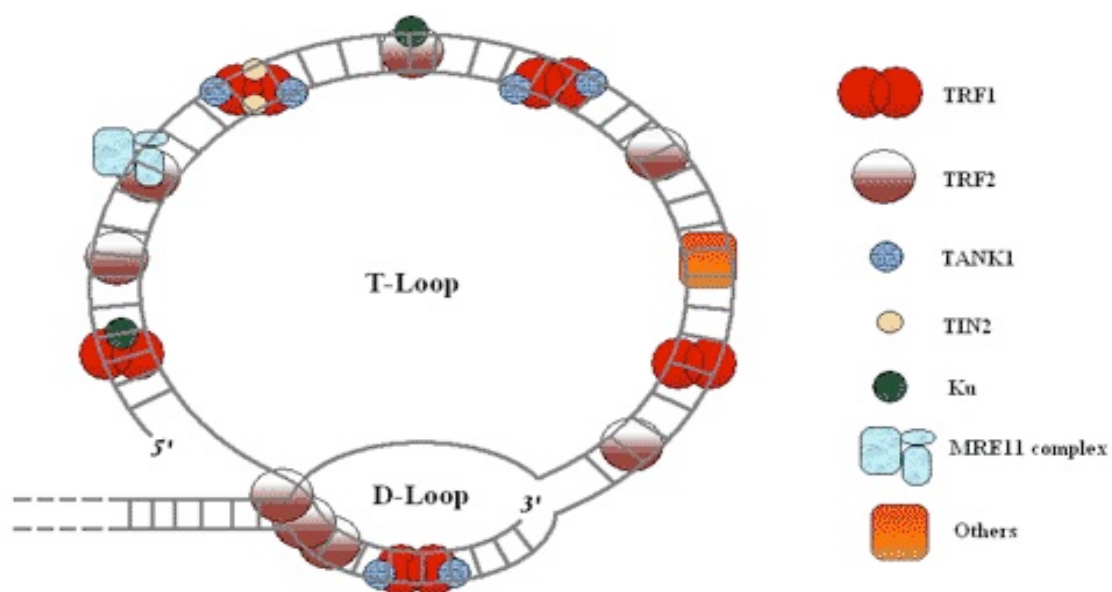
Στην κλασσική τους μορφή τα τελομερή των θηλαστικών κατανοούνται ως μια ευθύγραμμη δομή όπως φαίνεται στο (Σχήμα 16). Πρόσφατα όμως ηλεκτρονικά μικροσκόπια αποκάλυψαν ότι το τελικό τελομερές είναι μια μεγάλη διπλή δομή που αποτελείται από δύο βρόχους [247]. Αυτό λοιπόν το μοντέλο του τελομερούς συνηγορεί ότι το τελομερές αναδιπλώνεται γύρω από τον εαυτό του ώστε να δημιουργήσει αυτή την μεγάλη δομή βρόχου (T-loop). Η επικρεμάμενη-G (προεξέχουσα δομή) 3' άκρου, προσκολλάται στην διπλή έλικα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας του 5' άκρου κλώνου τελομερούς, σχηματίζοντας ένα μετατοπισθέντα βρόχο (D-loop) (Σχήμα 17). Έτσι και οι δύο δομές T-loop, D-loop αποκρύπτουν την επικρεμάμενη δομή του τελομερούς και κάποιοι εισηγούνται ότι αυτό παίζει προστατευτικό ρόλο καλύπτοντας την επικρεμάμενη δομή εντός του διπλού κλώνου.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι για την λειτουργικότητα του τελομερούς χρειάζονται τουλάχιστον 3 παράγοντες: ένα ελάχιστο μήκος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας TTAGGG, ακεραιότητα του επικρεμάμενου μέρους και ρύθμιση των προσκολλώμενων στο τελομερές πρωτεϊνών [248]. Υπάρχουν δύο κύριες πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο τελομερές, η TRF1 (Telomere repeat binding factor 1) και TRF2 (Telomere repeat binding factor 2). Η δράση και των δύο μπορεί να είναι είτε ανεξάρτητη είτε από την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Η TRF1 βρίσκεται στο διπλό κλώνο της αλληλουχίας TTAGGG του T-loop. Αυτή η πρωτεΐνη είναι ένα διμερές που βοηθάει στη δημιουργία και σταθεροποίηση του loop.

Το TRF1 είναι επίσης αρνητικός ρυθμιστής του μήκους του τελομερούς καθώς η ρύθμιση του μήκους του τελομερούς βασίζεται σε ανατροφοδοτικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την τελομεράση. Πειράματα έδειξαν ότι η ποσότητα του TRF1 μέσα στα κύτταρα επηρεάζει το μήκος του τελομερούς. Η υπερέκφραση του wild-type TRF1 μειώνει το μήκος του τελομερούς ενώ η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου TRF1 οδηγεί σε αύξηση του τελομερούς μέσω ενεργοποίησης της τελομεράσης [248-250].



Σχήμα 16. Κλασική μορφή του τελομερούς — ευθύγραμμη δομή των τελομερών με διαφορετικούς τύπους δεσμευόμενων πρωτεϊνών. (Από: Wai LK, *et al.* MedGenMed. 2004 Jul 26; 6(3):19).



Σχήμα 17. Νέα εμφάνιση της δομής του τελομερούς — διπλή δομή αποτελούμενη από την (T)-loop και την μετατεθημένη (D)-loop συνοδευόμενη από τις δεσμευόμενες στο τελομερές πρωτεΐνες. (Από: www.Medscape.com).

Πολλαπλά ένζυμα και πρωτεΐνες (tankyrase 1) & (tankyrase 2) έχουν ανευρεθεί να αλληλεπιδρούν με το TRF1 ρυθμίζοντας το μήκος του τελομερούς. Αυτά τα ένζυμα ενοχοποιούνται για αναστολή της δέσμησης του TRF1 στο DNA του τελομερούς. Σαν

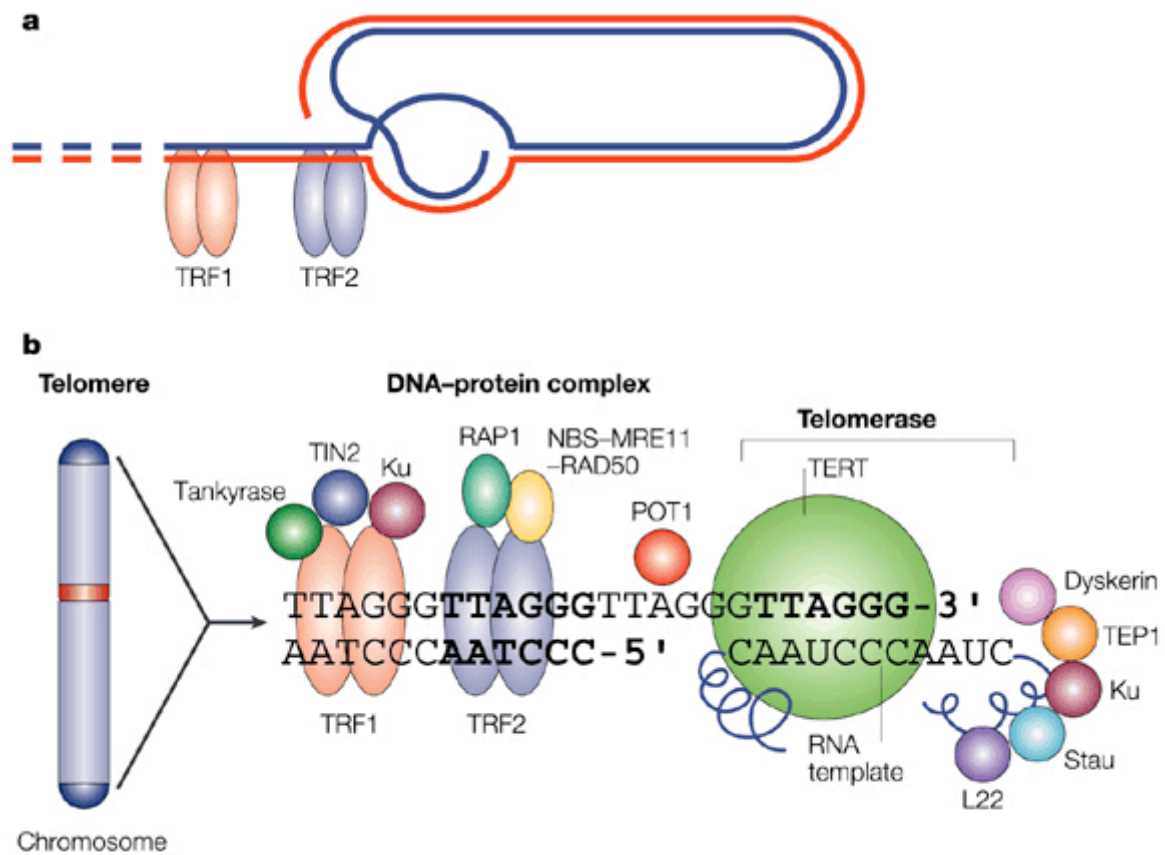
αποτέλεσμα η τελομεράση μπορεί να προσεγγίσει το τελομερές επιτρέποντας την επιμήκυνση του. Διαφορετικά οι tankyrases δρουν σαν θετικοί ρυθμιστές του μήκους του τελομερούς [249, 250].

Αντίθετα όταν ο παράγοντας TRF1 ενωθεί με την πρωτεΐνη TIN2 δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής του μήκους του τελομερούς και αυτό γιατί οδηγεί σε συμπύκνωση του DNA τελομερούς σταθεροποιώντας το T-loop περιορίζοντας έτσι την πρόσβαση της τελομεράσης [251].

Η πρωτεΐνη TRF2 βρίσκεται στην διπλό κλώνο TTAGGG στο T-loop και στο loop-tail junction. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του χρωματοσώματος. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου TRF2 οδηγεί σε απώλεια της δέσμευσης του TRF2 στο τελομερές, σε απώλεια της επικρεμμάμενης δομής, επαγωγή του ανεξάρτητου μονοπατιού του p53, στη σύντηξη του τέλους του χρωματοσώματος και σε αναστολή της ανάπτυξης όπως ακριβώς συμβαίνει στην γήρανση [248-250]. Η ρυθμιστική του ικανότητα είναι ανεξάρτητη της τελομεράσης. Επίσης η παρουσία του TRF2 στο loop-tail junction συνηγορεί την σταθεροποίηση της επικρεμμάμενης δομής (Σχήμα 18). Αυτό αποτρέπει τον μονό κλώνο να αναγνωριστεί σαν διάκενο DNA το οποίο ακολουθείτε από ενεργοποίηση του διορθωτικού μηχανισμού του DNA [250].

Το TRF2 μπορεί να αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη hRAP1 για την ρύθμιση του μήκους των τελομερών. Η υπερέκφραση της hRAP1 μπορεί να προκαλέσει επιμήκυνση του τελομερούς [248]. Το TRF2 μπορεί να επιστρατεύει επίσης το σύμπλεγμα MRE11 το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες RAD50, MRE11 και NBS1. Αυτό το σύμπλεγμα συμμετέχει επιδιόρθωση των διάκενων του διπλού κλώνου [248]. Το σύμπλεγμα της πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-PK) το οποίο αποτελείται από το Ku70, Ku86 καθώς και καταλυτικές υπομονάδες του DNA-PK, αλληλοεπιδρά με το TRF2 αναστέλλοντας την σύντηξη του τελομερούς διορθώνοντας τα διάκενα-θραύσματα του διπλού κλώνου του DNA [252, 253].

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις δομές του loop του τελομερούς και των συνοδευόμενων πρωτεϊνών είναι σημαντικές επειδή μας επιτρέπουν να καθιερώσουμε μοριακά μοντέλα του συμπλέγματος του τελομερούς. Παρόλα αυτά περαιτέρω έρευνα των λειτουργιών τους και ανεύρεση νέων δομών χρειάζονται ώστε να κατανοήσουμε περαιτέρω την συσχέτιση μεταξύ των ρυθμιστικών λειτουργιών και της προστασίας των χρωμοσωμικών τελών.



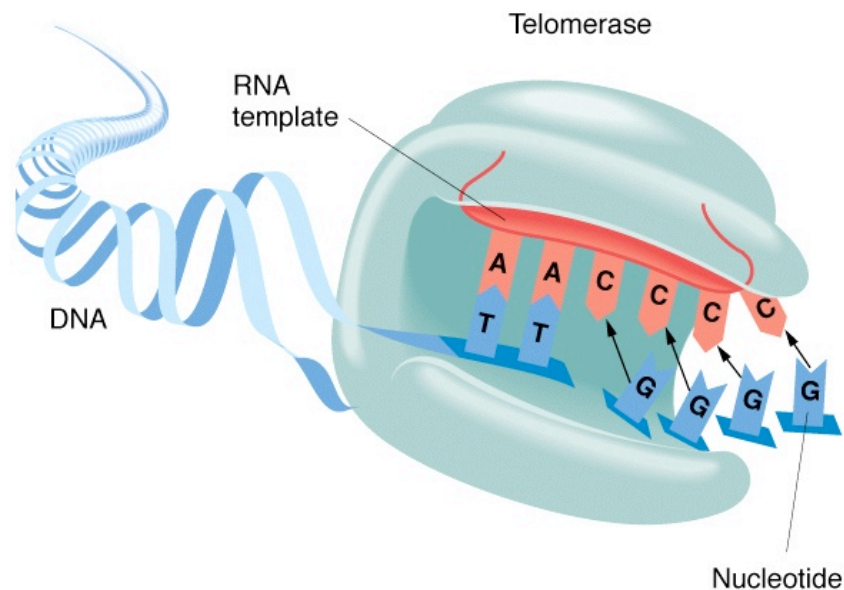
Σχήμα 18. Τελομερές με τις συνοδές πρωτεΐνες.

(Από: Richard J. Hodes, *et al.* Nature Reviews Immunology 2, 699-706 (September 2002))

3.2 Τελομεράση

3.2.1 Δομή και λειτουργία της τελομεράσης

Το ένζυμο της τελομεράσης είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη που δρα σαν αντίστροφη τρανσκριπτάση και είναι ο κύριος θετικός ρυθμιστής του μήκους του τελομερούς. (Σχήμα 19).



Σχήμα 19. Το μόριο της τελομεράσης.

Το ένζυμο αυτό αποτελείται από δύο μέρη, το telomere RNA component (TERC) και το telomere reverse transcriptase (TERT) [248, 252, 254]. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα της τελομεράσης δεν εκφράζεται σε φυσιολογικό σωματικό ιστό. Παρόλα αυτά ενεργότητα τελομεράσης έχει βρεθεί σε μιτωτικά ενεργά κύτταρα όπως είναι τα λεμφοκύτταρα, το ενδομήτριο, το δέρμα, ο πεπτικός σωλήνας. Η ενεργότητα της τελομεράσης σε αυτά τα ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ρυθμίζεται με την ανάπτυξη.

Τα βλαστικά κύτταρα εκφράζουν τελομεράση ώστε να διατηρούν το μήκος των τελομερών καθ' όλο τον κύκλο της ζωής τους [255, 256]. Περίπου το 90% των καρκινικών κυττάρων έχουν κοντά τελομερή και υψηλά επίπεδα ενεργότητας της τελομεράσης. Για παράδειγμα το 75% των καρκίνων του στόματος, το 80% των καρκίνων του πνεύμονος, το

84% των καρκίνων προστάτου, το 85% των καρκίνων του ήπατος, το 93% των καρκίνων του μαστού, το 94% των νευροβλαστομάτων, το 95% του ορθοκολικού καρκίνου, το 98% των καρκίνων της ουροδόχου κύστης έχουν αξιολογήσιμη ενεργότητα τελομεράσης [257]. Παραμένει λοιπόν να διευκρινιστεί αν η τελομεράση αποτελεί ένα ευαίσθητο βιοδείκτη για σωστή διάγνωση, έγκαιρη ανεύρεση και πρόγνωση του καρκίνου.

Τα φυσιολογικά κύτταρα που εκφράζουν τελομεράση όπως είναι τα επιθηλιακά κύτταρα του οφθαλμού, οι ινοβλάστες της ακροποσθίας, τα οποία έχουν μολυνθεί από ξενιστές που κωδικοποιούν (h)TERT, επιδεικνύουν επιμήκυνση του τελομερούς ενώ τα αντίστοιχα controls των κυττάρων που δεν εκφράζουν τελομεράση δείχνουν μείωση του μήκους του τελομερούς και φυσιολογική γήρανση [258]. Το ίδιο και σε επίμυες που δεν εκφράζουν τελομεράση κατέδειξαν χρωμοσωμικά τέλη φτωχά σε τελομερή, σύντηξη των χρωμοσωμικών τελών και απώλεια της βιωσιμότητας. Η ένταξη της τελομεράσης απέτρεψε όλα τα πιο πάνω γεγονότα να συμβούν επιβεβαιώνοντας ότι η τελομεράση μπορεί να βελτιώσει την επιβίωση, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής [248].

Η έκφραση της τελομεράσης ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα, συμπεριλαμβάνοντας την μετάφραση, την σύνδεση του mRNA, την ωρίμανση και την μετατροπή του hTERT και hTERC. Το hTERT φαίνεται να είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας στην ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης. Θετικοί ρυθμιστές στην αντιγραφή του hTERT είναι το ογκογονίδιο cmyc, ο αντιγραφικός παράγον Sp1, ο υιός των ανθρώπινων κονδυλωμάτων HPV16, η πρωτεΐνη E6, και οι στεροειδείς ορμόνες [259]. Αρνητικοί ρυθμιστές στην αντιγραφή του hTERT περιλαμβάνουν το αντιγραφικό παράγοντα Mad1, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, pRB, E2F, τον όγκο του Wilms' 1, και ένα αριθμό από παράγοντες έναντι του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης όπως είναι η ιντερφερόνη-γ και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγον-β (TGF-β) [259].

3.2.2 Ενεργότητα τελομεράσης και ογκογένεση

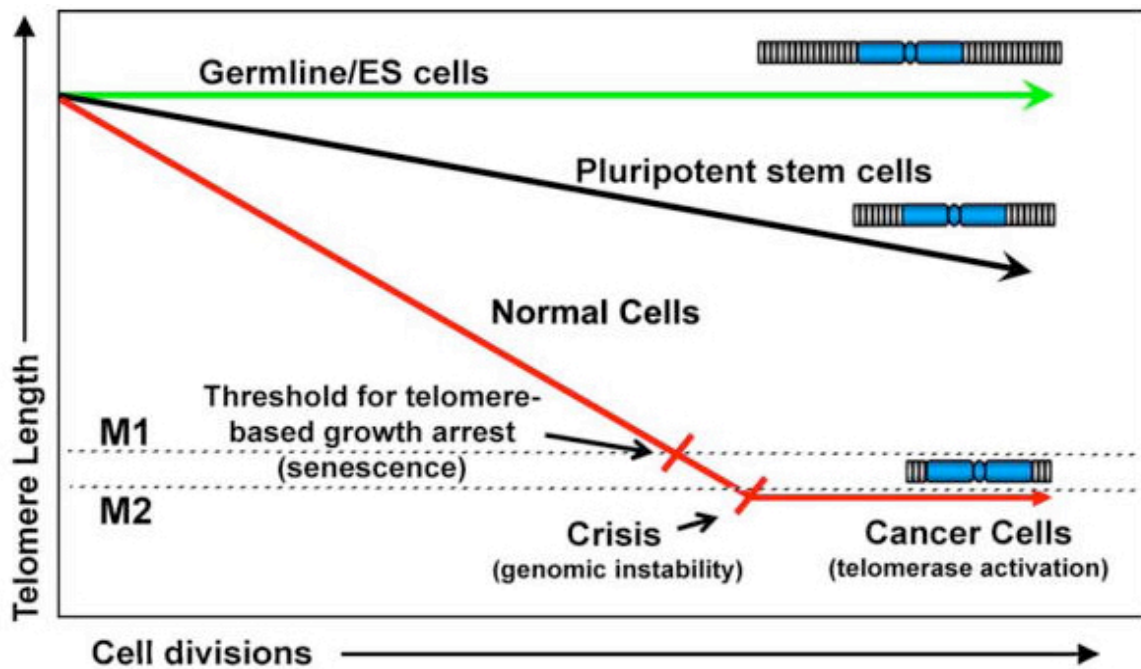
Το μήκος του τελομερούς δρα σαν εσωτερικό βιολογικό ρολόι που ρυθμίζει το μήκος ζωής του κυττάρου, στο οποίο ο αριθμός των διπλασιασμών του κυττάρου έχουν ήδη υπολογιστεί προτού το κύτταρο εισέλθει στην κυτταρική γήρανση. Οπότε το τελομερές περιορίζει την δυνατότητα του κυττάρου να αντιγραφεί, επάγοντας την γήρανση σαν ένας “ογκοκατασταλτικός” μηχανισμός. Όπως συζητήθηκε, μετά από επαναλαμβανόμενους κυτταρικούς διπλασιασμούς το τελομερές μειώνεται-μικραίνει. Όταν φτάσει σε ένα κρίσιμο μήκος, η επαγωγή της γήρανσης συνοδεύεται από την ενεργοποίηση ενός αριθμού μονοπατιών όπως είναι το p53, p21, and the Rb/p16^{INK4A} cell-cycle checkpoint pathway [243]. Αποτέλεσμα έχει την αναστολή της αύξησης και την επερχόμενη απόπτωση.

Οι ανθρώπινοι ινοβλάστες νεαρών ατόμων έχουν μακριά τελομερή ενώ σε πιο ηλικιωμένα άτομα αυτά είναι πιο κοντά. Ως εκ τούτου άτομα με σύνδρομα πρόωρης γήρανσης όπως είναι (Werner's syndrome and Hutchinson-Gilford's syndrome), έχουν κοντύτερα τελομερή συγκριτικά με του υγιείς ανθρώπους της ίδιας ηλικίας [260]. Η εισαγωγή της καταλυτικής υπομονάδας του hTERT στα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα οδηγεί σε ατελείωτο και χωρίς έλεγχο πολλαπλασιασμό. Φαίνεται λοιπόν ότι η μείωση του μήκους του τελομερούς καταλήγει σε κυτταρική γήρανση ή σε στάδιο θνητότητας M1 (mortality stage 1) [261-263]. Όταν το μονοπάτι της αναστολής του κυτταρικού κύκλου έχει παρακαμφθεί, τα τελομερή θα οδηγηθούν σε περαιτέρω μείωση του μήκους τους (Σχήμα 20).

Ένα πολύ κοντό τελομερές μπορεί να αναγνωρισθεί σαν διάκενο διπλού κλώνου μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών της DNA damage-response όπως είναι (ATM, Ku, and Mrt-2/Rad17). Αυτές οι πρωτεΐνες οδηγούν σε ομόλογη ανασύσταση ή σε μη ομόλογη σύντηξη των τελών του χρωματοσώματος. Κύτταρα με ασταθή χρωματοσώματα είναι στην κριτική φάση 2 [M2 (mortality stage 2)] τα οποία κατευθείαν οδηγούνται σε απόπτωση [261, 263, 264].

Παρόλα αυτά στα καρκινικά κύτταρα η παράκαμψη της κρίσιμης φάσης του κυτταρικού κύκλου, θα οδηγήσει σε περαιτέρω μείωση του μήκους του τελομερούς με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τελομεράσης [265, 266]. Έτσι τα τελομερή

σταθεροποιούνται σε συγκεκριμένο μήκος. Κάποια ανθρώπινα κύτταρα από όγκους δεν εκφράζουν τελομεράση και μπορούν να διατηρούν το μήκος τους μέσω άλλου μηχανισμού (alternative lengthening of telomeres) [267, 268]. Το μήκος του τελομερούς σε αυτούς τους καρκίνους είναι εξαιρετικά μικρό της τάξης των 2-4kb έναντι 20kb στα βλαστικά κύτταρα και στα εμβρυονικά κύτταρα [269].



Σχήμα 20. Η υπόθεση τελομερούς-τελομεράσης — Αλλαγές στο μήκος του μήκος του τελομερούς ανιχνεύονται σπερματικά κύτταρα, στα βλαστικά κύτταρα, στα σωματικά κύτταρα και στα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα και εμβρυονικά κύτταρα διατηρούν σχεδόν πλήρες το μήκος του τελομερούς, συνεπεία της έκφρασης της τελομεράσης. Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα έχουν ρυθμίσει την ενεργότητα της τελομεράσης και έτσι μειώνουν μήκος τελομερούς κατά την διάρκεια της ζωής αλλά με μειωμένο ρυθμό. Πολλά σωματικά κύτταρα δεν εκφράζουν τελομεράση και έτσι χάνουν μήκος τελομερούς μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση με αυξημένο ρυθμό μέχρι να εισέλθουν σε αναστολή της ανάπτυξης που ονομάζεται γηρασμός. Σε απουσία των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (π.χ. μονοπάτι p53/pRB), τα κύτταρα παρακάμπτουν τον γηρασμό μέχρι να φτάσουν στο σημείο κρίσης. Στο σημείο κρίσης τα τελομερή είναι τόσο μικρά ώστε τα χρωμοσωμικά τέλη συγχωνεύονται και υπάρχει αυξημένη γενομική αστάθεια (πιθανότατα λόγω χρωματοσωμικής, καταστροφής, σύντηξης κλπ.). Σπάνια κύτταρα μπορούν να διαφύγουν του σημείου κρίσης μέσω επανενεργοποίησης της τελομεράσης ώστε αυτό το κύτταρο πλέον να ονομάζεται καρκινικό με δυνατότητα αέναου πολλαπλασιασμού. Σχεδόν όλα τα καρκινικά κύτταρα έχουν κοντά τελομερή με αποτέλεσμα οι αναστολές της τελομεράσης να οδηγούν το κύτταρο σε αποπτωτικό θάνατο.

(Από: J.W. Shay, W.E. Wright / Seminars in Cancer Biology 21 (2011) 349–353)

Τα σταθεροποιημένα τελομερή προσφέρουν αθανатоποίηση [270] και τα αθανатоποιημένα καρκινικά κύτταρα ξεπερνούν έτσι το φραγμό της M1 φάσης της γήρανσης και της M2 φάσης της κρίσης και αποκτούν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται εις το άπειρο. Εννοείται βεβαίως ότι μόνη της η αθανатоποίηση δεν επαρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήτης εξαλλαγή προϋποθέτει ένα καταρράκτη γεγονότων και πολυσταδιακών διαδικασιών, συμπεριλαμβάνοντας την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. p53 και pRB) και ανεξέλεγκτη μιτωτική διέγερση [271].

Αντίθετα οι ανθρώπινοι ινοβλάστες που έχουν μορφοποιηθεί με το αντιγόνο του simian virus 40, δεν θα προχωρήσει σε καρκινική εξαλλαγή παρόλο που ενεργοποιήθηκε το ογκογονίδιο ras, αν δεν έχει αθανатоποιηθεί πρωτίστως.

Αυτά όλα τα ευρήματα συνηγορούν ότι τα η καρκινική εξαλλαγή χρειάζεται πολλαπλούς ογκογενετικούς παράγοντες. Η ενεργοποίηση της τελομεράσης προσφέρει αθανатоποίηση αλλά όχι νεοπλαστικές ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα [272].

3.2.3 Θεραπευτική της τελομεράσης

Οπότε, το μήκος του τελομερικού DNA επηρεάζει το προσδόκιμο επιβίωσης του κυττάρου στις κυτταροκαλλιέργειες αλλά και ενός οργανισμού in-vivo [273]. Η σμίκρυνση του τελομερούς μπορεί επίσης να επιταχυνθεί μέσω πολλών ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να επάγουν την καταστροφή του τελομερικού DNA [274]. Η υπερβολική μείωση του μήκους του τελομερούς συνοδεύεται όχι μόνο από μείωση του προσδόκιμου επιβίωσης αλλά επίσης και από γενομική αστάθεια που μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση [275-277].

Τα κοντά και μη λειτουργικά τελομερή μπορεί να αναγνωριστούν σαν καταστροφή του DNA το οποίο εν συνεχεία θα οδηγήσει σε p53-εξαρτώμενη απόπτωση [278]. Σαν φυσιολογική λοιπόν κυτταρική διαδικασία, τα τελομερή διέπονται από σταδιακή μείωση του μήκους τους προϊούσης της ηλικίας, οπότε περιορίζουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και προσδόκιμο επιβίωσης των φυσιολογικών κυττάρων [279, 280]. Παρόλο που το μήκος του

τελομερούς και ο ρυθμός μείωσης του μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα διαφορετικά ήδη ιστών στον ανθρώπινο οργανισμό, το τελικό μήκος του τελομερούς σχετίζεται αντίστροφα με την ηλικία [279-284].

Ο ρυθμός της μείωσης του μήκους του τελομερούς επηρεάζεται από ποικίλους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες περιλαμβανομένου γενετικών και επιγενετικών σημάτων, οξειδωτικών μεταβολιτών, έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και προσωπικού τρόπου ζωής [279, 285-291]. Επί παραδείγματι, το κάπνισμα, η έλλειψη γυμναστικής, κατανάλωση ανθυγιεινώς διατροφής (περίσσεια λίπος και επεξεργασμένο κρέας, και μειωμένη λήψη φρούτων, λαχανικών, ινών και αντιοξειδωτικών), μπορεί να επιταχύνουν την μείωση του μήκους των τελομερών, η οποία εν συνεχεία μπορεί να προδιαθέσει σε προβλήματα υγείας που σχετίζονται με την ηλικία όπως καρδιοπάθειες, καρκίνος και μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης [276, 277, 292-299]. Συνοψίζοντας τα τελομερή διατηρούν την σταθερότητα του χρωματοσώματος αλλά μικραίνουν με την ηλικία οπότε και περιορίζουν την τον αριθμό των πολλαπλασιασμών του κύτταρο κατά την διάρκεια της ζωής του σε κυτταροκαλλιέργειες αλλά και in-vivo. Το προσδόκιμο επιβίωσης του κυττάρου εξαρτάται από το μήκος του τελομερούς αλλά και από τον ρυθμό μείωσης αυτού. Ανθυγιεινή διατροφή και κακή ποιότητα ζωής μπορεί να αυξήσουν τον ρυθμό μείωσης του μήκους του τελομερούς που κατ' επέκταση θα οδηγήσει σε νοσήματα σχετιζόμενα με την ηλικία.

4. Κυκλοξυγενάση-2 (COX-2) και Προσταγλανδίνη E2 (PGE2)

4.1 Κυκλοξυγενάσες

4.1.1 Εισαγωγή Κυκλοξυγενάση-2

Το μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος ευθύνεται για την παραγωγή βιοενεργών μεταβολιτών. Αυτοί οι μεταβολίτες, γνωστοί και ως εικοσανοειδή, έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν σε πολλές διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις περιλαμβάνοντας τις φλεγμονές και τις κακοήθειες [300]. Το αραχιδονικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί σε ενεργά εικοσανοειδή μέσω της επενέργειας τριών ενζυμικών ομάδων: τις κυκλοξυγενάσες (COX), λιποξυγενάσες (LOX) και τις εποξυγενάσες (κυτόχρωμα P450).

Οι κυκλοξυγενάσες καταλύουν το πρώτο στάδιο της σύνθεσης προσταγλανδινών από το αραχιδονικό οξύ [301]. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 η COX βρέθηκε να υπάρχει σε δύο ισομορφές την COX-1 & COX-2 που συνοδεύεται από φλεγμονή [302]. Βρέθηκε επίσης και μια τρίτη μορφή, την COX-3 [303], χωρίς όμως δραστηριότητα κυκλοξυγενάσης σε ιστούς ανθρώπινους [304]. Οι προσταγλανδίνες και οι θρομβοξάνες είναι βιολογικά ενεργείς μεταβολίτες οι οποίοι εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως ρύθμιση του τόνου των αγγείων, η φλεγμονώδης απάντηση και η προστασία του στομάχου. Οι προσταγλανδίνες έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για διάφορες νόσους όπως είναι η αρθρίτιδα, η καρδιακή και πνευμονική υπέρταση [305].

Η ανάπτυξη του καρκίνου έχει συσχετιστεί με διαταραχή στο ισοζύγιο της σηματοδότησης του COX [301, 306]. Υπάρχει ένα σημαντικό ενδιαφέρον για το COX-2 και το ρόλο του στην ανάπτυξη καρκίνου με αρκετές μελέτες (φάσης II) που μελετούν την δυνατότητα της χρήσης του σαν χημειοπροστατευτικό σκεύασμα [307-310]. Η έκφραση του COX-2 έχει συσχετιστεί με φτωχή πρόγνωση σε ποικίλους καρκίνους [311-313]. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για να διερευνηθούν τον ρόλο της αναστολής της COX-2 σαν χημειοπροστασία έναντι του καρκίνου [314-318]. Η επίδραση της έκφρασης της COX στον

καρκίνο θεωρείται ότι σχετίζεται με την έκφραση των προσταγλανδινών. Επιβεβαίωση της επίδρασης των προσταγλανδινών στην καρκινογένεση προέρχεται από πολλές επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν ότι η χρόνια χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) και συγκεκριμένα της ασπιρίνης, αποτρέπει την ανάπτυξη της νόσου [319]. Παρόλα αυτά η σχέση των προσταγλανδινών με την ανάπτυξη του καρκίνου δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί [320]. Προηγούμενες μελέτες έχουν εισηγηθεί ότι η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών στους καρκίνους διαφέρει από αυτή στους φυσιολογικούς ιστούς [321, 322]. Αυξημένη έκφραση του COX-2 έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα ενζύμων που χρειάζονται για την σύνθεση προσταγλανδινών, το οποίο δείχνει ότι η εξέλιξη του όγκου από την υπερέκφραση του COX-2 αποδίδεται σε προϊόντα του αραχιδονικού οξέος και του μεταβολισμού [323].

4.1.2 Μεταβολισμός της κυκλοξυγενάσης: ταξινόμηση προσταγλανδινών

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, έχουν αναγνωρισθεί δύο ισομορφές του COX μέχρι σήμερα, το COX-1 και το COX-2. Το COX-1 εκφράζεται στους πιο πολλούς ιστούς. Οι προσταγλανδίνες που παράγονται από αυτή την ισομορφή, δρουν κυτταροπροστατευτικά στο γαστρικό βλεννογόνο, στην νεφρική κυκλοφορία και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Εντούτοις το COX-1 έχει βρεθεί να συμμετέχει σε περιοχές φλεγμονής [324, 325]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του COX-1 επάγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα σαν απάντηση κάποιου ερεθίσματος [326, 327]. Η COX-1 είναι η μόνη ισομορφή που εκφράζεται εντός των αιμοπεταλίων και είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

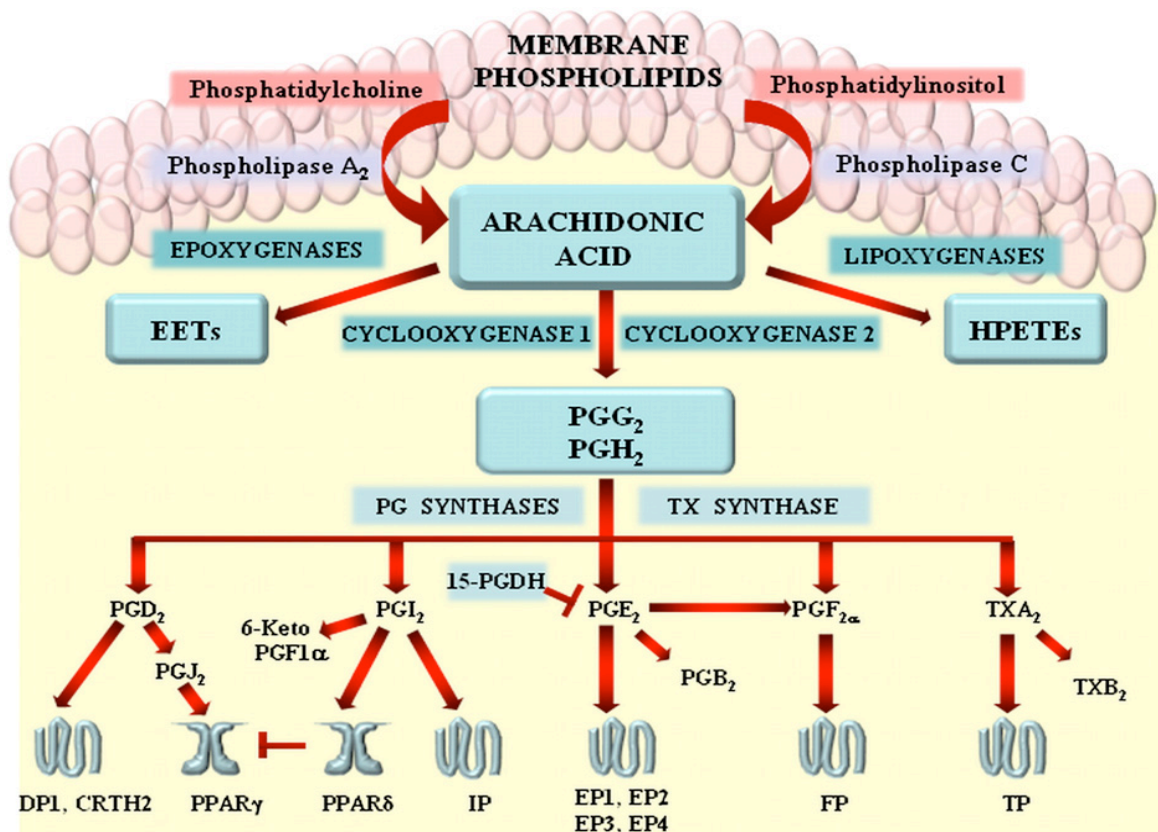
Η COX-2 επάγεται σε ορισμένους μόνο ιστούς όπως είναι ο εγκέφαλος, ο νωτιαίος μυελός [328], ο νεφρός [329]. Η έκφραση της COX-2 περιορίζεται αυστηρά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και διεγείρεται έντονα σε συνθήκες φλεγμονής μετά από επίδραση κυτοκινών, όπως είναι η ιντερφερόνη- γ , TNF- α , IL-1 β [330, 331], ορμονών [332], αυξητικών παραγόντων [333-335] καθώς και σε συνθήκες υποξίας [336, 337]. Η έκφραση της COX-2 έχει παρατηρηθεί επίσης σε νεοπλασματικά και ενδοθηλιακά κύτταρα πολλών διαφορετικών όγκων [338].

Το κλειδί στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της COX είναι η ενζυματική μετατροπή του αραχιδονικού οξέος στο PGG₂ το οποίο έπειτα μετατρέπεται σε ένα ασταθές ενδιάμεσο ενδοπεροξειδίο PGH₂. Το τελευταίο καταλύεται σε προσταγλανδίνες μέσω των ενζύμων (προσταγλανδίνη-E συνθετάση, προσταγλανδίνη D-συνθετάση, προσταγλανδίνη F-συνθετάση, συνθετάση της προστακυκλίνης, συνθετάση της θρομβοξάνης) (Σχήμα 21). Τα τελικά προϊόντα (προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες) είναι ασταθή οπότε και μεταβολίζονται ταχέως in-vivo [339].

4.1.3 Κυκλοξυγενάση-2 (COX-2) και καρκίνος γαστρεντερικού (ΓΕΣ)

Η παρατήρηση ότι η COX-2 υπερεκφράζεται (από 2 έως 50 φορές) στα ορθοκολικά αδενώματα και στα αδenoκαρκινώματα, έχει διεγείρει την έρευνα ώστε να διαλευκανθεί πλήρως η σχέση μεταξύ του COX-2 και του καρκίνου [340]. Αρχικά το COX-2 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο ArcMin/+ mouse model με μετάλλαξη στο APC (Adenomatous Polyposis Coli) γονίδιο, το οποίο καθιστά την οικογενή πολυποδίαση [341]. Περαιτέρω μελέτες επιβεβαίωσαν ότι το COX-2 υπερεκφράζεται σταθερά σε έναν σημαντικό αριθμό κακοηθειών αλλά και προκαρκινικών όγκων [342]. Υπήρξε η εισηγήση μήπως η COX-2 αποτελέσει τον τελικό στόχο μελλοντικής θεραπείας του ορθοκολικού καρκίνου. Επίσης εκ των υστέρων μελέτες επιβεβαίωσαν αύξηση της έκφρασης του COX-2 κατά 50% στα αδενώματα και κατά 85% στα αδenoκαρκινώματα [343, 344].

Ο ρόλος του COX-2 στον ΟΚΚ αποδείχθηκε σε μοριακό επίπεδο σε in-vivo μελέτες, στις οποίες η καταστροφή του γονιδίου του COX-2 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του όγκου στο λεπτό και στο παχύ έντερο του ArcMin/+ mice [345]. Οι μεταλλάξεις στο APC γονίδιο οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και συσχετίζονται συχνά με τα αρχικά στάδια του ΟΚΚ [346]. Οι γενετικές και φαρμακολογικές μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το COX-2 δεν υποεκφράζεται στο APC γονίδιο, αλλά ότι η μετάλλαξη του APC γονιδίου οδηγεί σε υπερέκφραση του COX-2 και προάγεται η ανάπτυξη και εξέλιξη του ΟΚΚ [347].



Σχήμα 21. Παραγωγή προσταγλανδινών μέσω της κατάλυσης του αραχιδονικού οξέος από την COX. Το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται μέσω ενός από τα τρία σηματοδοτικά μονοπάτια: της κυκλοξυγενάσης (COX), της λιποξυγενάσης (LOX) και της P-450 εποξυγενάσης. Ενώ η LOX και η εποξυγενάση σηματοδοτούν παράγει μεταβολίτες υδροπεροξυ-εικοσατετρανοειδή οξέα (HPETEs) και εποξυ-εικοσατριονικά οξέα (EETs) αντίστοιχα, η COX-1 & -2 καταλύουν την δημιουργία της PGH₂ από το αραχιδονικό οξύ. Το PGH₂ μετατρέπεται επιπλέον σε προσταγλανδίνες μέσω της επίδρασης εξειδικευμένων συνθετασών/ισομερασών. Τα ΜΣΑΦ αλλά και οι εκλεκτικοί αναστολείς της COX-2 καταστρέφουν το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι στο επίπεδο των ισομορφών της COX, και υπόσχονται αποτελέσματα στις κακοήθειες του γαστρεντερικού. Πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στοχεύοντας τους μεσολαβητές της σηματοδότησης του COX με την δυνατότητα να αποφύγουν ανεπιθύμητες παρενέργειες παράλληλη την διατήρηση της αντι νεοπλασματικής τους δράσης. Οι προσταγλανδίνες ασκούν την δράση τους δεσμευόμενοι σε ειδικούς υποδοχείς G-protein. Οι προσταγλανδίνες και οι μεταβολίτες τους μπορεί να δεσμευτούν σε πυρηνικούς υποδοχείς όπως είναι οι peroxisome-proliferator-activated receptors (PPARs). Οι προσταγλανδίνες όπως είναι η PGE₂ μπορεί να αποδομηθούν με την βοήθεια ενζύμων αποδόμησης των προσταγλανδινών όπως είναι η 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)

(Από: Cathcart MC *et al.* Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1825(1):49-63)

Στους ασθενείς με οικογενή πολυποδίαση (FAP) η χρήση ΜΣΑΦ καθώς και η εκλεκτική αναστολή του COX-2 φαίνεται να μειώνει το μέγεθος και τον αριθμό των αδενωμάτων [348-350]. Καθώς η σχέση μεταξύ του OKK και της έκφρασης του COX-2 είναι από τις πιο μελετημένες στους πολύποδες, αδενώματα και καρκίνους [351] του εντέρου, φαίνεται να υπάρχει και ρόλος της COX-1 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου και του ορθού.

4.2 Προσταγλανδίνες (PGs)

4.2.1 Προσταγλανδίνες στην ανάπτυξη και εξέλιξη των κακοηθειών του ΓΕΣ

4.2.1.1 Το μονοπάτι της προσταγλανδίνης E2

Από όλες τις προσταγλανδίνες, η PGE2 είναι η πιο ευρέως μελετημένη στην καρκινογένεση του γαστρεντερικού. Και υπάρχει ισχυρή υπόνοια ότι μέσω της PGE2 προάγεται η προ-φλεγμονώδης δράση και η ογκο-εξελικτική δράση της COX-2, στην ανάπτυξη και εξέλιξη των όγκων. Είναι γνωστό ότι η PGE2 έχει ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση, με αποτέλεσμα η παραγωγή αυτής της προσταγλανδίνης να επιτρέπει στους όγκους να αποφευχουν τον ανοσολογικό έλεγχο, και επομένως να προάγεται η ανάπτυξη του όγκου [352].

Στο καρκίνο στομάχου φαίνεται να επάγει την έκφραση του VEGF μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού EGFR/MAP κινασών. Η υπερέκφραση της COX-2 παράλληλα με την αύξηση της αγγειογένεσης και την έκφραση της SLC2A1 (GLUT-1), έχει συσχετιστεί με καρκίνο της χοληδόχου κύστης [353]. Στον OKK είναι η πιο συχνά εκφραζόμενη προσταγλανδίνη [354]. Το προϊόν της COX-2, η PGH2 μετατρέπεται μέσω της συνθετάσης της προσταγλανδίνης E2 στην PGE2, η οποία στην συνέχεια διεγείρει την εξέλιξη του OKK.

Αυξημένη έκφραση του COX-2 είναι εμφανής στην πλειονότητα των όγκων του γαστρεντερικού. Ενώ τα ΜΣΑΦ και οι εκλεκτικοί αναστολείς του COX-2 μπορεί να

αναστείλουν την εξέλιξη του καρκίνου, οι απόλυτοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί που διέπουν αυτά τα αποτελέσματα είναι ακόμα ασαφείς.

Επιπλέον η αυξημένη επικινδυνότητα του καρδιαγγειακού η οποία συνοδεύει την χρόνια χρήση των εκλεκτικών αναστολέων COX-2, αποδεικνύει ότι εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια χρειάζονται.

Οι πρόσφατες έρευνες έχουν προσανατολιστεί στη μελέτη του ρόλου της σηματοδότησης της κυκλοξυγενάσης στην καρκινογένεση του γαστρεντερικού. Η PGE2 είναι η πιο ευρέως μελετημένη προσταγλανδίνη. Παρόλο που οι προσταγλανδίνες που προέρχονται από το COX, δυνητικά μπορεί να αποτελέσουν θεραπεία για την καρκινογένεση του γαστρεντερικού, εντούτοις περισσότερες προκλινικές και κλινικές μελέτες χρειάζονται για να υποστηρίξουν κάποια αρχικά ευρήματα [355].

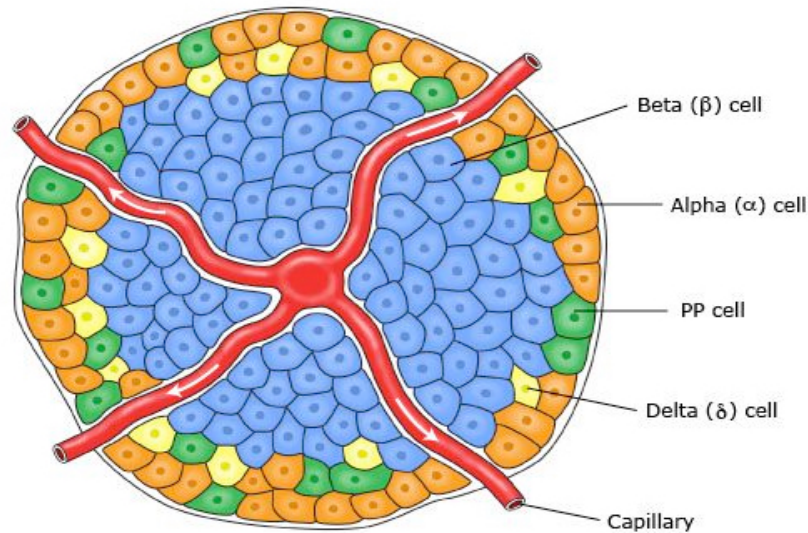
5. Τροφικοί παράγοντες (ινσουλίνη, IGF), οκτρεοτίδη

5.1 Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη (51-αμινοξέων), η οποία συντίθεται και εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Τα β-κύτταρα βρίσκονται στα νησίδια του Langerhans, τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος και περιέχουν κάποιες εκατοντάδες ή χιλιάδες ενδοκρινικά κύτταρα. Τα νησίδια αυτά ξεχωρίζουν ανατομικά και λειτουργικά από τα υπόλοιπα εξωκρινικά κύτταρα του παγκρέατος (τα οποία εκκρίνουν παγκρεατικά ένζυμα κατευθείαν στον αυλό του δωδεκαδακτύλου). Σε φυσιολογικούς ανθρώπους τα νησίδια αυτά αποτελούν το 1 έως 2% της μάζας του παγκρέατος, ζυγίζουν περίπου 1-2gr και είναι 1,000,000 σε αριθμό. Ποικίλουν σε μέγεθος, από 50-300μm. Το 70% των νησιδίων αποτελούνται από β-κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από α-κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνη, από ακόμα λιγότερα δ-κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη και από τα PP κύτταρα που παράγουν παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (Σχήμα 22). Όλα τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω εξωκυττάρων χώρων και διάκενων συνδέσμων. Η διάταξη αυτή έχει σημασία γιατί επιτρέπει τα προϊόντα από διαφορετικούς τύπους κυττάρων να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Παράδειγμα όταν εκκρίνεται ινσουλίνη από τα β-κύτταρα, μειώνει την έκκριση γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα.

Η ινσουλίνη συντίθεται σαν προ-προινσουλίνη στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου. Η προ-προινσουλίνη έπειτα διαιρείται σε προινσουλίνη η οποία μεταφέρεται στη συσκευή Golgi όπου γίνεται δέσμη από εκκριτικά κοκκίδια στην μεμβράνη του κυττάρου. Η προινσουλίνη διαιρείται ισομερώς σε ινσουλίνη και C-πεπτίδιο στα εκκριτικά κοκκίδια.

Η διαδικασία της έκκρισης ινσουλίνης περιλαμβάνει την σύντηξη των εκκριτικών κοκκιδίων με την μεμβράνη των κυττάρων και εξωκυττάρωση της προινσουλίνης, ινσουλίνης και του C-πεπτιδίου. Η βασική έκκριση ινσουλίνης (μη-διεγερμένης) γίνεται με ώσεις περιοδικότητας 9-14 λεπτών [356]. Απώλεια της περιοδικότητας αυτής στην βασική έκκριση ινσουλίνης συνεπάγεται πρώιμο σημείο ανεπάρκειας των β-κυττάρων σε ασθενείς που πιθανότατα θα αναπτύξουν τύπου-I διαβήτη [357].



Σχήμα 22. Σχηματική παρουσίαση της ανατομικής σχέσης στο νησίδιο του Langerhans. Τα β-κύτταρα (β) που παράγουν ινσουλίνη (μπλε χρώμα) και βρίσκονται στο κέντρο κοντά στα αγγεία. Περιβάλλονται από τα άλφα κύτταρα (α) (πορτοκαλί χρώμα) τα οποία παράγουν γλυκαγόνη. Εξωτερικά είναι τα δέλτα κύτταρα (δ) (κίτρινο χρώμα) τα οποία παράγουν σωματοστατίνη και τα PP κύτταρα (πράσινο χρώμα) τα οποία παράγουν παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. (Από: www.Urptodate 2013).

Η δράση της ινσουλίνης ξεκινά με την δέσμευση αυτής με το εταιρο-τετραμερικό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου στόχου. Οι υποδοχείς ινσουλίνης είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο ξεχωριστά τμήματα (τα συνδεδεμένα με ινσουλίνη α-περιοχή) και (β-περιοχή που μετατρέπει το σήμα). Όταν η ινσουλίνη δεσμευτεί με τον υποδοχέα προσαρμόζονται οι αλλαγές στην α-περιοχή ώστε να επιτρέψουν την ATP να δεσμευτεί με την β-περιοχή στο ενδοκυττάριο τμήμα. Η δέσμευση της ATP οδηγεί σε ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης στην β-περιοχή που αυτοφωσφορυλιώνει τον υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα εν συνεχεία φωσφορυλιώνει τα πρωτεϊνικά υποστρώματα ξεκινώντας με το πρωτεϊνικό υπόστρωμα της ινσουλίνης (Insulin protein substrate - IRS) 1 και 2 [358-361].

5.1.1 Σηματοδότηση της ινσουλίνης

Τα σήματα ινσουλίνης μεταφέρονται περαιτέρω μέσω φωσφορυλίωσης περιλαμβάνοντας άλλες ενδοκυττάρειες ουσίες. Μέσω αυτών όλων των σηματοδοτικών μονοπατιών, η ινσουλίνη δρα σαν ένας ισχυρός ρυθμιστής του μεταβολισμού.

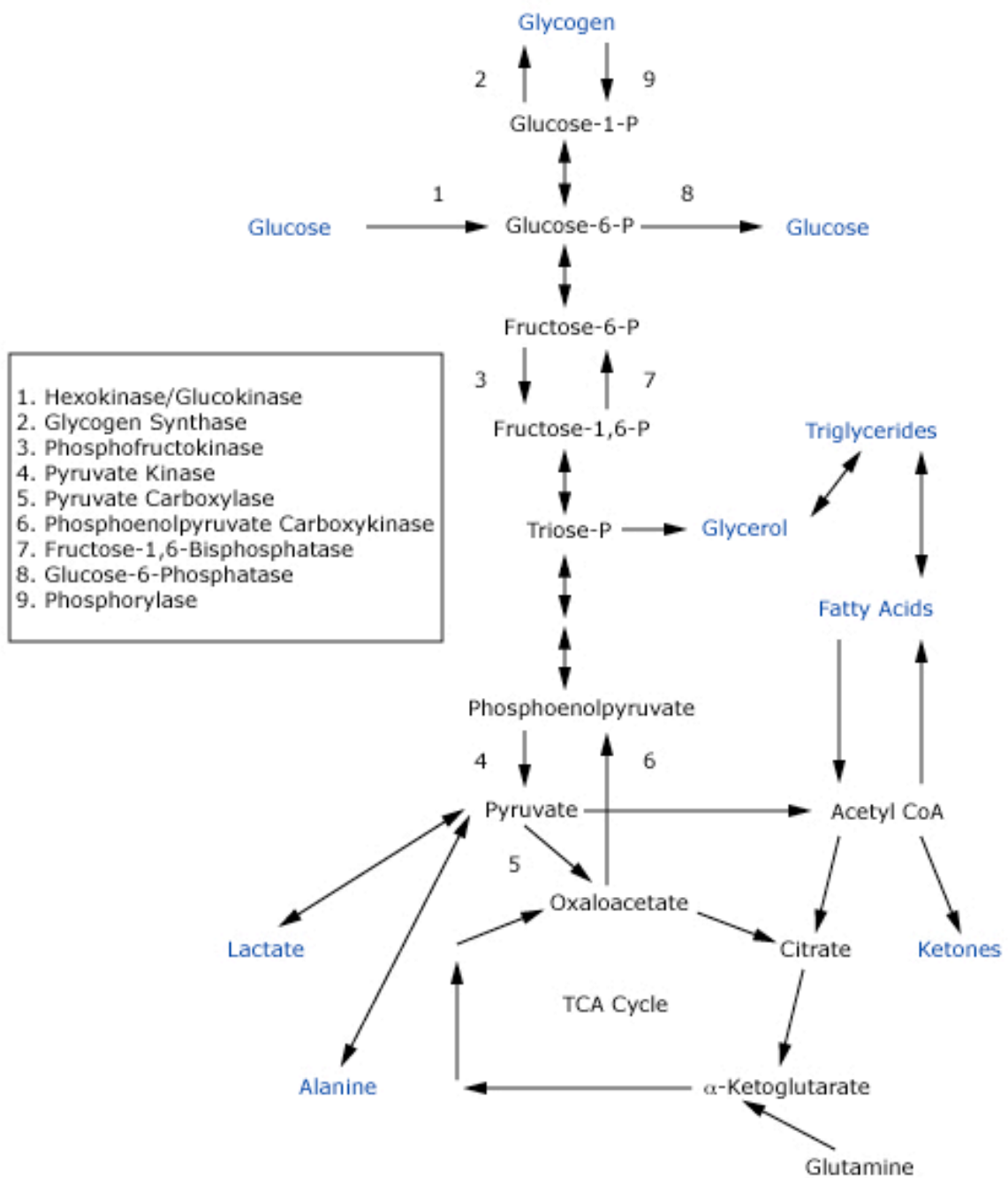
Επιπλέον η ενεργοποίηση, μέσω του υποδοχέα της ινσουλίνης, του μονοπατιού της πρωτεϊνικής MAP κινάσης, έχει εμπλέξει την δράση της ινσουλίνης στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό [359].

Κλινικό ενδιαφέρον έχουν οι βλάβες στην σηματοδότηση της ινσουλίνης οι οποίες έχουν φανεί σε διάφορα σύνδρομα με αντίσταση στην ινσουλίνη όπως είναι επί παραδείγματι στην Νοσογόνο Παχυσαρκία.

5.1.2 Μεταβολική δράση της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη άμεσα ή έμμεσα επηρεάζει την λειτουργία κάθε κυττάρου στον οργανισμό. Η κυριότερη επίδραση της ινσουλίνης είναι στους τρεις ιστούς που είναι υπεύθυνοι για την αποθήκευση της ενέργειας (ήπαρ, μυϊκός ιστός, λιπώδης ιστός).

Η γλυκόζη μπορεί να αντληθεί από τρεις πηγές: εντερική απορρόφηση φαγητού, γλυκογονόλυση (μετατροπή του γλυκογόνου σε γλυκόζη) και γλυκονεογένεση (σύνθεση γλυκόζης από υδαάνθρακες, πρωτεΐνες και μεταβολισμό του λίπους). Όταν μεταφερθεί στο κύτταρο η γλυκόζη μπορεί να αποθηκευτεί σαν γλυκογόνο ή να προχωρήσει σε γλυκόλυση και παραγωγή πυρουβικού οξέος. Το πυρουβικό οξύ μπορεί να γίνει γαλακτικό οξύ, αλανίνη ή να μετατραπεί σε ακετυλό-CoA. Το τελευταίο μπορεί να οξειδωθεί σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό ή να μετατραπεί σε λιπαρά οξέα σαν τριγλυκερίδια, ή να χρησιμοποιηθεί στην σύνθεση χοληστερόλης (Σχήμα 23).



Σχήμα 23. (Από: Cryer PE, Polonsky KS. Glucose homeostasis and hypoglycemia. In: Williams Textbook of Endocrinology, 9th ed, Wilson, JD, Foster, DW, Kronenberg, HM, Larsen, PR (Eds), WB Saunders Co., Philadelphia 1998. p.940. Copyright ©1998 Elsevier Science).

Η δράση της ινσουλίνης στον μεταβολισμό της γλυκόζης περιλαμβάνει:

- Αναστολή της γλυκογονόλυσης και γλυκονεογένεσης,
- Αύξηση της μεταφοράς της γλυκόζης στο μυϊκό και λιπώδη ιστό,
- Αύξηση της γλυκόλυσης στους μύες και στο λίπος
- Διέγερση της σύνθεσης γλυκογόνου

5.1.3 Παρακρινική δράση της ινσουλίνης

Η έκκριση της ινσουλίνης συμβαίνει σε στενή σχέση με άλλα όρμονο-εκκρινικά κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων όπως είναι τα α- και δ- κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν ορμόνες όπως η γλυκαγόνη και η σωματοστατίνη αντίστοιχα. Η ινσουλίνη έχει παρακρινική επίδραση με τα γειτονικά αυτά κύτταρα.

Επιπλέον οποιαδήποτε διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης, όπως είναι η υπεργλυκαιμία ή η υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων, μπορεί να μεταβάλλουν την έκκριση των υπολοίπων άλλων ορμονών. Αυτές οι μεταβολές εν συνεχεία επηρεάζουν την ενδοκρινική δράση της ινσουλίνης. Επί παραδείγματι, η υπεργλυκαιμία από μόνη της διεγείρει τα δ- κύτταρα για έκκριση σωματοστατίνης που αυτή εν συνεχεία επιδρά στα α-κύτταρα ώστε να μειωθεί η παραγωγή γλυκαγόνης.

5.1.4 Άλλες ενέργειες της ινσουλίνης

Γίνεται ολοένα και πιο φανερό ότι η ινσουλίνη έχει δράσεις και πέραν της σφαίρας του μεταβολισμού και της ενέργειας, περιλαμβάνοντας δράσεις στη στεροειδογένεση, στη λειτουργία των αγγείων, στην ινοδόλυση και στην αύξηση. Από κλινικής σκοπιάς, ανώμαλη απάντηση στην ινσουλίνη έχει ενοχοποιηθεί στην παθογένεια του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών, καρδιαγγειακής νόσου, θρόμβωσης και ανάπτυξης συγκεκριμένων κακοηθειών στο οποίο θα επεκταθούμε αμέσως πιο κάτω.

Η φυσιολογική έκκριση και δράση της ινσουλίνης είναι υψίστης σημασίας για την φυσιολογική αύξηση. Μέσω της αναβολικής της δράσης στις πρωτεΐνες και στον μεταβολισμό των λιπιδίων αλλά και στις αλληλεπιδράσεις με άλλους αυξητικούς μεσολαβητές (όπως είναι

οι Insulin-like growth factors – IGF-1 και 2), και τους υποδοχείς τους, η ινσουλίνη διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της αύξησης.

Από παθολογικής σκοπιάς, υπάρχει σημαντική απόδειξη ότι η ινσουλίνη συμβάλλει στην ανάπτυξη διαφόρων κακοηθειών συμπεριλαμβανομένου του ορθοκολικού καρκίνου (ΟΚΚ), του καρκίνου των ωοθηκών και του καρκίνου του μαστού. Οι υποδοχείς της ινσουλίνης και του IGF-1 συνήθως υπερεκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του καρκίνου του μαστού, με τα επίπεδα υποδοχέων ινσουλίνης να είναι δέκα φορές πιο υψηλά από το φυσιολογικό. Η υπερέκφραση αυτή μπορεί να παραχωρεί στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του μαστού πλεονέκτημα στην επιλεκτική αύξηση, ιδιαίτερα στην παρουσία υπερινσουλαιμίας. Διασταυρούμενες προοπτικές μελέτες έχουν βρει στενή συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης υψηλών επιπέδων ινσουλίνης νηστείας και αυξημένου ρίσκου για καρκίνο του μαστού [362], καθώς επίσης και φτωχότερη πρόγνωση σε γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού, ανεξαρτήτως από την δείκτη μάζας σώματος [363].

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν βρει επίσης συσχέτιση μεταξύ καρκίνου του παχέος εντέρου και υπερινσουλαιμίας [364, 365]. Αυτές οι παρατηρήσεις είναι σταθερές και αμετάβλητες και σε in-vivo και σε in-vitro μελέτες επισημαίνοντας ότι η ινσουλίνη διεγείρει την ανάπτυξη των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων και των καρκινικών σειρών [366, 367].

Πολλά μοντέλα έχουν προταθεί για τον ρόλο της ινσουλίνης στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, συμπεριλαμβάνοντας και την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα του IGF-1 μέσω των αλλαγών που επάγονται από την ινσουλίνη στην συγκέντρωση των πρωτεϊνών που συνδέονται με το IGF-1 στον ορό [368, 369].

Αυξημένα επίπεδα adiponectin, μιας ορμόνης που εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό ο οποίος λειτουργεί σαν εσωτερικός διεγέρτης της ινσουλίνης, έχουν αντίστροφος συσχετιστεί με αυξημένη επίπτωση καρκίνου του ενδομητρίου, του μαστού και του παχέος εντέρου [370-373]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η adiponectin επηρεάζει την καρκινογένεση είναι άγνωστος. Διάφορες υποθέσεις όμως θέλουν την adiponectin να επιδρά άμεσα και κατευθείαν στα κακοήθη κύτταρα, ή να επιδρά έμμεσα μέσω μείωσης των επιπέδων της κυκλοφορούσας ινσουλίνης και IGF-1.

5.1.5 Ινσουλίνη και καρκίνος

In-vitro μελέτες έδειξαν ότι κύτταρα από καρκίνο παχέος εντέρου, μαστό, προστάτη και ουροδόχου κύστης, τα οποία αναπτύσσονται σε υπεργλυκαιμικές συνθήκες, επιταχύνουν την αύξηση μετά από επίδραση της ινσουλίνης [374]. Η αύξηση αυτή συνοδεύεται με μια αύξηση της μετάφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου όπως είναι η κυκλίνη A1, η κυκλίνη E, και ο μεταφραστικός παράγοντας E2F [374].

Οπότε φαίνεται πολύ πιθανόν η υπερινσουλιναίμια σε παχύσαρκούς και διαβητικούς ασθενείς μπορεί να αυξάνει τον κίνδυνο συγκεκριμένων τύπων καρκίνου αυξάνοντας την σηματοδότηση των υποδοχέων ινσουλίνης, οδηγώντας σε επιδράσεις πολλαπλασιαστικές και αντι-αποπτωτικές. Μειώνοντας έτσι ίσως τα επίπεδα ινσουλίνης ή επίσης μπλοκάροντας την σηματοδότηση της ινσουλίνης μπορεί να είναι αρκετό ώστε να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου.

Διάφορες μελέτες έχουν εισηγηθεί ότι οι «ευαισθητοποιητές» της ινσουλίνης (δηλ. το metformin), μπορεί να προστατέψει έναντι της ανάπτυξης του καρκίνου. Σε μια ομάδα ασθενών με διαβήτη τύπου-II, αυτοί που έπαιρναν metformin είχαν λιγότερη επικινδυνότητα να αναπτύξουν καρκίνο συγκριτικά με αυτούς που δεν έπαιρναν [375]. In-vitro μελέτες σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, έδειξαν ότι το metformin διεγείρει την AMP κινάση και αναστέλλει τον στόχο της rapamycin, οδηγώντας σε μείωση του πολλαπλασιασμού και αναστολή του κυτταρικού κύκλου [376, 377].

5.1.5.1 Αντίσταση στην ινσουλίνη και καρκινογένεση: ο ρόλος της ινσουλίνης

Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι ένα από τα κύρια συστατικά του μεταβολικού συνδρόμου, δηλ. ενός συνόλου επικίνδυνων παραγόντων οι οποίοι συμβαίνουν ταυτόχρονα και αυξάνουν το ρίσκο για επιπλέον νοσήματα, περιλαμβάνοντας ΣΔ τύπο-II και πολλαπλές άλλες μεταβολικές διαταραχές [376, 377], εγκεφαλικά και καρδιαγγειακά νοσήματα [378, 379], νεύρο-εκφυλιστικές διαταραχές, [378, 379], λοιμώδη νοσήματα [380, 381] και βεβαίως ανάπτυξη καρκίνου [382, 383].

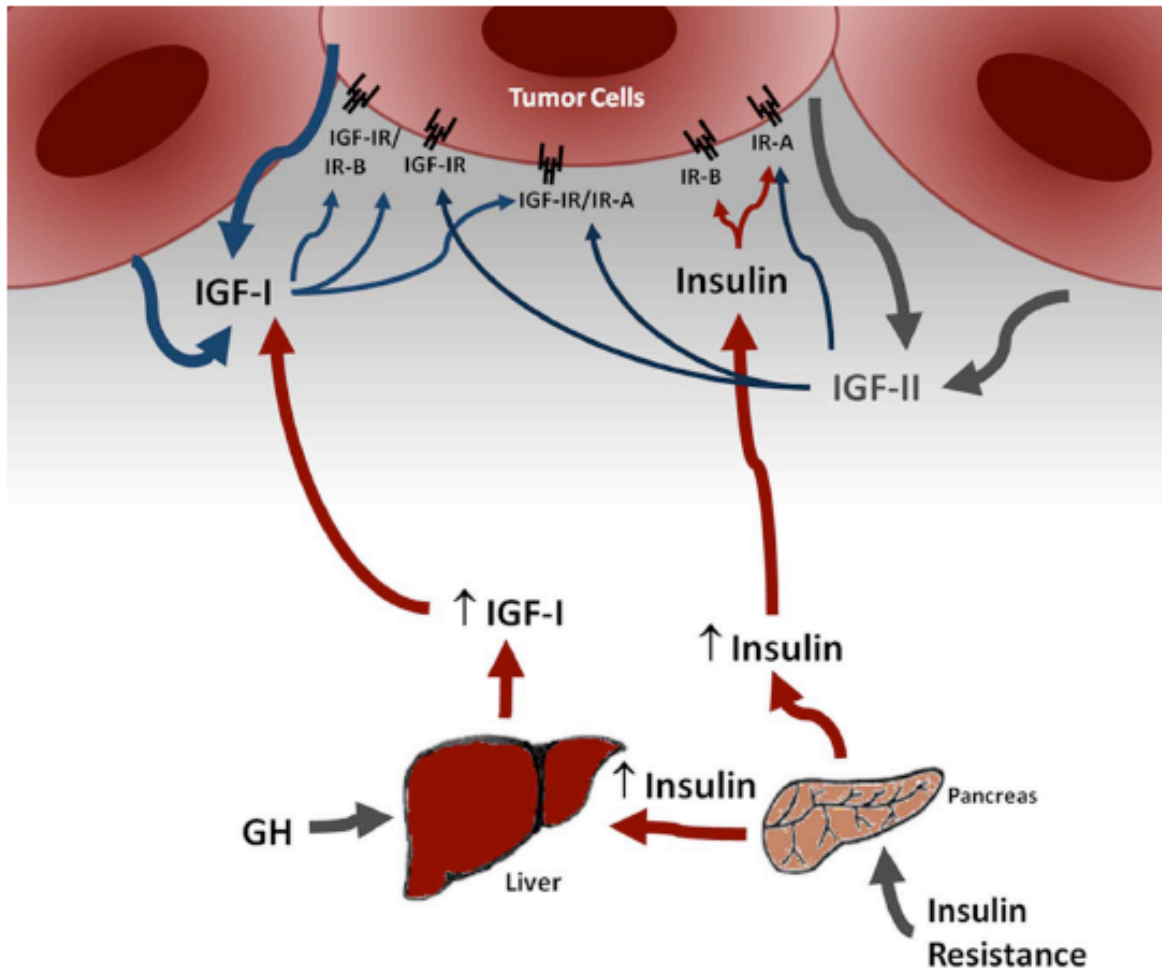
Από την άλλη μεριά όμως, ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία καταδεικνύουν μια συσχέτιση ανάμεσα στο ΣΔ τύπου-II και στην αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνων του μαστού, προστάτου, παχέος εντέρου, ενδομητρίου και ωθηκών [384-386]. Τα ευρήματα από αυτήν την μελέτη εισηγούνται ότι η επίπτωση του καρκίνου είχε μειωθεί μετά από την σκόπιμη απώλεια βάρους σχεδόν σε όλες τις προοπτικές μελέτες καθώς και στις τυχαίοποιημένες μελέτες, μετά από διαιτητική θεραπεία, αλλά και μετά την Βαριατρική χειρουργική.

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί συσχέτιση ανάμεσα στην επιπρόσθετη απώλεια βάρους και στη μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων καθώς και στην αύξηση των επιπέδων SHBG με ταυτόχρονη τρεις φορές σημείωση της ελεύθερου οιστραδιόλης, με μόλις 10% απώλεια βάρους.

Σε μια πρόσφατη μετά ανάλυση έχει αποδειχθεί ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του ενδομητρίου, και έχει συσχετιστεί με υψηλά επίπεδα adipokines like adiponectin, λεπτίνης και αναστολέα της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου καθώς και ανδρογόνων και φλεγμονωδών διαμεσολαβητών [387].

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι διαβητικοί ασθενείς έχουν σχετικά αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο καθώς και χειρότερη πρόγνωση από καρκίνο συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς διαβήτη.

Η υπερινσουλιναιμία η οποία προέρχεται από την προσπάθεια του οργανισμού να ανταπεξέλθει στην αντίσταση στην ινσουλίνη στον διαβήτη τύπου-II, μπορεί να ευνοήσει τους ευαίσθητους στην ινσουλίνη καρκίνους, αυξάνοντας ουσιαστικά την ανάπτυξή τους μέσω των σημάτων από τους υποδοχείς ινσουλίνης (IR-A) και υποδοχείς IGF1 (IGF1R). (Σχήμα 24).



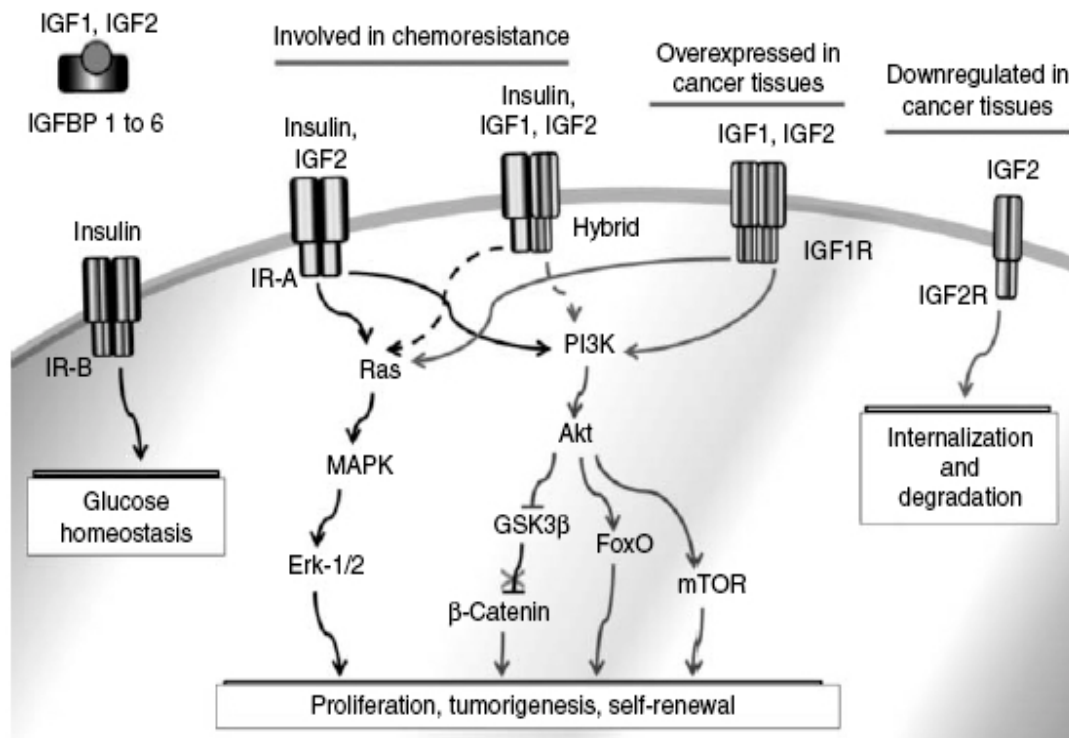
Σχήμα 24: Ενδοκρινικά, αυτοκρινικά και παρακρινικά σήματα ινσουλίνης, IGF1 και IGF2 σε καρκινικό ιστό. Σχηματική παρουσίαση της επίδρασης της αντίστασης της ινσουλίνης στην παραγωγή ινσουλίνης και της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στη ηπατική παραγωγή IGF1 αλλά και στην αυτοκρινή και παρακρινή παραγωγή IGF1 και IGF2 από κύτταρα όγκου (Από: Emily J. Gallagher and Derek LeRoith *Endocrinology*, Jul 2011, 152(7):2546–2551).

5.2. IGF-1

Πειραματικά δεδομένα εισηγούνται ότι ο IGF1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Για παράδειγμα, κλινικές και πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι το γονίδιο IGF1 εκφράζεται ειδικά σε ιστό από καρκίνο του προστάτου [388-390].

Οι υποδοχείς της ινσουλίνης IR-A, και οι υποδοχείς της IGF1 (IGF1R), επάγουν την δράση τους μέσω ογκογενετικών σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt, Ras/MAPK, και b-

catenin, εξηγώντας τουλάχιστον εν μέρη την εμπλοκή τους στην καρκινογένεση (Σχήμα 25), καθώς και την ικανότητα της υπερέκφρασης ινσουλίνης και IGF1 σε σημείο που να αυξηθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου σε παχύσαρκους ασθενείς ή σε ασθενείς με συγγενής 1^{ου} βαθμού με διαβήτη.



Σχήμα 25. Insulin-like polypeptides (ILP) σηματοδότηση και καρκίνος. Οι υποδοχείς των ILP δομικά σχετίζονται με τους υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης. Η σηματοδότηση των κανονικών υποδοχέων της ινσουλίνης ισομορφή A (IR-A) και ισομορφή B (IR-B) και του υποδοχέα IGF1 (IGFR1), επάγεται μέσω μονοπατιών όπως phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR), PI3K/Akt/forkhead box O (FoxO), Ras/MAPK/ extracellular signal-related kinase 1/2 (ERK-1/2) pathways, ή μέσω PI3K/Akt mediated inactivation of glycogen synthase kinase 3b (GSK3b) που έχουν ως αποτέλεσμα την συσσώρευση της β catenin και την ενεργοποίηση των στόχων της. Υπερέκφραση των IGF1R σηματοδότησης καθώς και των IR-A αναφέρονται συχνά στους καρκίνους ιδιαίτερα σε παθολογικά αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης και IGF. (Από: Sefirin Djioque *et al.* Endocrine-Related Cancer (2013) 20, R1–R17)

5.3 Σωματοστατίνη

Η σωματοστατίνη είναι μια φυσική ορμόνη (ανασταλτικό πολυπεπτίδιο) που απομονώθηκε αρχικά από τον υποθάλαμο του προβάτου [391]. Κατανέμεται ευρέως σε όλο το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του ανθρώπου αλλά και στους περιφερικούς ιστούς.

Η σωματοστατίνη έχει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ενεργειών, που περιλαμβάνουν την ρύθμιση των νευροδιαβιβαστών, την ρύθμιση και αναστολή της αυξητικής ορμόνης (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), ορμόνες του γαστρεντερικού (GI), παγκρεατικά ένζυμα και νευροπεπτίδια [392, 393]. Ρυθμίζει την γαστρική κένωση, τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών και την αιμάτωση του εντέρου [394]. Επίσης αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων [395].

Υπάρχουν δύο βιολογικές μορφές της σωματοστατίνης: Η σωματοστατίνη-14 και η σωματοστατίνη-28, οι οποίες προέρχονται από ένα 92-amino acid pro-somatostatin precursor [396, 397]. Οι ευρέως αντιεκρηκτικές ιδιότητες της σωματοστατίνης την καθιστούν ένα πολύ σημαντικό φάρμακο.

Τα ανάλογα σωματοστατίνης όπως είναι η οκτρεοτίδη και λανρεοτίδη, έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί αρχικά σε κλινικό επίπεδο για την αντιμετώπιση της ακρομεγαλίας και των γαστρο-εντεροπαγκρεατικών όγκων [398].

Η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της δεσμεύονται σε υποδοχείς οι οποίοι ανήκουν σε επτά διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (G protein coupled receptors superfamily) [399]. Η φυσική σωματοστατίνη 14 δεσμεύεται με μεγαλύτερη συγγένεια στους σωματοστατινικούς υποδοχείς (SSTR)₁₋₄, ενώ η σωματοστατίνη 28 είναι πιο επιλεκτική στον υποδοχέα SSTR₅ [400] (Πίνακας 2). Από την άλλη, οκτρεοτίδη και λανρεοτίδη δεσμεύονται επιλεκτικά στον υποδοχέα SSTR₂, με μικρότερη συγγένεια στον υποδοχέα SSTR₅ και SSTR₃ [401].

Πίνακας 2. Η συγγένεια της σωματοστατίνης-14 (SRIF-14), σωματοστατίνης 28 (SRIF-28), λανρεοτιδής, οκτρεοτιδής και SOM230 με τους, ανθρώπινος (h), αρουραίος (r), επιμύες (m), υποδοχείς σωματοστατίνης SSTR1, 2, 3, 4, and 5.

[Από: Bruns *et al.* (1996), Hoyer *et al.* (2000), και Schmid and Schoeffter (2004)].

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
SRIF-14	8.6–9.5 (h, pKi) 8.4 (r, pIC50)	8.9–10.5 (h, pKi) 8.8 (r, pKi) 9.14–8.99 (r, pEC50) 8.8–9.6 (m, pKi)	8.7–10.0 (h, pKi) 8.9 (r, pKi) 10.1 (m, pIC50)	8.4–9.3 (h, pKi) 8.2 (r, pKi)	8.4–9.9 (h, pKi) 8.4 (r, pKi) 7.7–9.1 (m, pKi)
SRIF-28	8.6–9.4 (h, pKi)	8.4–10.2 (h, pKi) 8.8 (r, pKi) 9.0–9.5 (m, pKi)	8.1–9.9 (h, pKi) 9.1 (r, pKi) 10.2 (m, pKi)	8.1–9.2 (h, pKi)	9.2–10.3 (h, pKi) 9.0 (r, pKi) 9.8–9.9 (m, pKi)
Lanreotide	–	8.7–9.6 (h, pKi) 8.8 (r, pKi) 6.9–9.1 (m, pKi)	7.2–8.0 (h, pKi) 6.9 (r, pKi) 8.2 (m, pIC50)	–	7.4–9.3 (h, pKi) 7.6 (m, pKi)
Octreotide	–	8.7–9.9 (h, pKi) 8.7 (r, pKi) 7.5 – 9.2 (m, pKi)	7.4–8.6 (h, pKi) 7.8 (r, pKi) 8.5 (m, pIC50)	–	7.2–9.9 (h, pKi) 7.8 (r, pKi) 7.7–9.9 (m, pKi)
SOM-230	8.0 (h, pIC50)	9.0 (h, pIC50) 7.76 – 9.07 (r, pEC50)	8.8 (h, pIC50)	–	9.8 (h, pIC50)

5.3.1 Οι υποδοχείς σωματοστατίνης και ο σηματοδοτικός καταρράκτης

5.3.1.1 Αντιεκκρητική δράση σωματοστατίνης

Η σωματοστατίνη θεωρείται σαν αναστολέας όλων των εκκρίσεων. Αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH), της προλακτίνης (PRL), της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH), της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH), του προσθίου λοβού της υπόφυσης [391, 402-407]. Αναστέλλει την χολοκυστοκινίνη (CCK), την γαστρίνη, την σεκρετίνη, το εντερικό πολυπεπτίδιο, την μοτιλίνη από τον εντερικό σωλήνα, αναστέλλει την γλυκαγόνη, την ινσουλίνη, και το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο από τη ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος [408-412], επίσης αναστέλλει την ρενίνη από τους νεφρούς, την αλδοστερόνη από το επινεφρίδια [413-415].

Επιπλέον η σωματοστατίνη καταστέλλει την εξωκρινή δράση του παγκρέατος περιλαμβάνοντας και την απελευθέρωση γαστρικού οξέος από το εντερικό βλεννογόνο όπως και διπτανθρακικών και ένζυμων της πέψης από την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος [409, 416-418]. Στον γαστρεντερικό σωλήνα η σωματοστατίνη αναστέλλει την έκκριση της χολής από την χοληδόχο κύστη, την εντερική κινητικότητα και γαστρική κένωση, την σύσπαση των λείων μυϊκών ινών και την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών από το λεπτό έντερο [419-421].

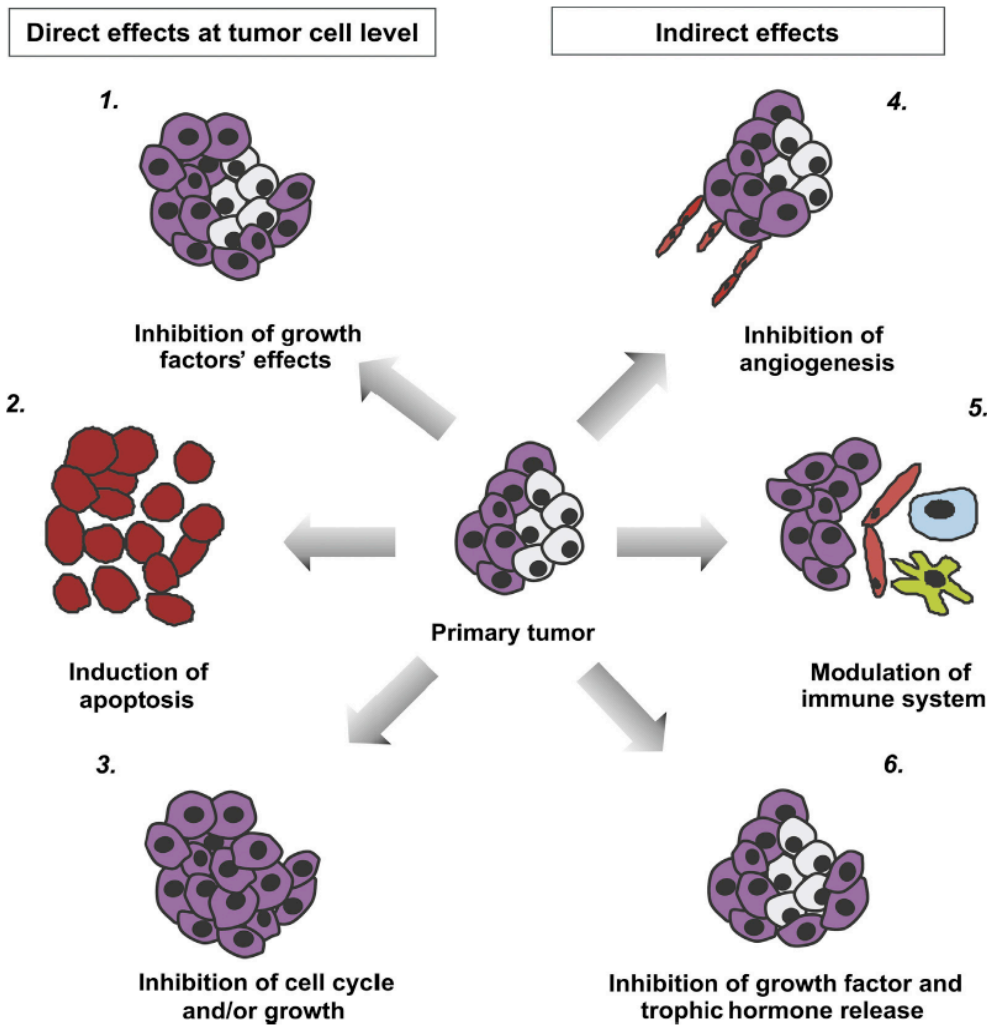
Επίσης η σωματοστατίνη βρέθηκε να αναστέλλει τις κυτοκίνες από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού [422].

5.3.1.2 Δράσεις σωματοστατίνης έναντι του πολλαπλασιασμού

Η αντικαρκινική δράση της σωματοστατίνης συμβαίνει μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών (Σχήμα 26). Ο αντικαρκινικός μηχανισμός συσχετίζεται με την διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή/και μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης με την ενεργοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης (SSTR) στον καρκινικό ιστό. Ενώ ο μέσος μηχανισμός περιλαμβάνει την αναστολή της αγγειογένεσης του όγκου η οποία επάγεται από τους υποδοχείς σωματοστατίνης (SSTR), καθώς και την αναστολή παραγωγής προϊόντων που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του όγκου.

5.3.1.3 Η άμεση οδός αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης των υποδοχέων σωματοστατίνης

Ένας από τους πρώτους περιγραφόμενους μηχανισμούς αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης των υποδοχέων σωματοστατίνης ήταν και η αναστολή του σηματοδοτικού υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα [423-425]. Η πρωτεΐνη των τυροσινικών φωσφατασών (PTPs), φάνηκε να παίζει κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία μέσω της αποφωσφορυλίωσης του αυξητικού παράγοντα να δεσμεύει τους υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης [426]. Η ενεργότητα της πρωτεΐνης των τυροσινικών φωσφατασών αυξάνεται μετά την επίδραση σωματοστατίνης σε πολλαπλά κυτταρικά συστήματα [427-429] καθώς και σε καρκινικές κυτταρικές καλλιέργειες [430].



Σχήμα 26. Η πολλαπλασιαστική δράση των ανάλογων σωματοστατίνης στα καρκινικά κύτταρα. Η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της μπορούν να προκαλέσουν συρρίκνωση του όγκου μέσω άμεσων επιδράσεων στο καρκινικό κύτταρο (1) Αναστολή της σηματοδότησης των υποδοχέων σωματοστατίνης (SSTR) στη σηματοδότηση που επάγεται από αυτοκρινικούς αυξητικούς παράγοντες στα καρκινικά κύτταρα, καθώς επίσης και αναστολή της αυτοκρινικής έκκρισης του αυξητικού παράγοντα από τα καρκινικά κύτταρα, (2) Κυτταροστατική σηματοδότηση που επάγεται μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης (SSTR), (3) Κυτταροτοξική δράση των υποδοχέων σωματοστατίνης (π.χ. με επαγωγή της απόπτωσης), ή εμμέσως με επίδραση στα συστατικά του μικρό-περιβάλλοντός του όγκου (4) Μπλοκάροντας τη νεοαγγείωση (5) Αναστέλλοντας την έκκριση σημάτων για ανάπτυξη του όγκου από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, (6) Μπλοκάροντας την έκκριση παρακρινούς αυξητικού παράγοντα. Τα κύτταρα του όγκου φαίνονται σε χρώμα φούξια. Τα οικιακά ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνονται σε χρώμα κόκκινο. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού σε πράσινο και μπλε. Τα αποπτωτικά κύτταρα σε χρώμα καφέ. (Από: Theodoropoulou M et al., *Frontiers in Neuroendocrinology* 34 (2013) 228–252)

5.3.1.4 Έμμεση οδός αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης της σωματοστατίνης

Η σωματοστατίνη ανακόπτει την μιτογόνο δράση των αυξητικών παραγόντων, όχι μόνο αναστέλλοντας τον σηματοδοτικό καταρράκτη, αλλά επίσης και υπό-ρυθμίζοντας την σύνθεση τους. Ένας από τους πιο σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες που υπό-ρυθμίζονται από την σωματοστατίνη είναι ο Insulin-like growth factor 1 (IGF-1).

Η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της είναι επίσης ικανά να αναστείλουν την αγγειογένεση. Η πρώτη ένδειξη του αντι-αγγειογενετικού ρόλου της σωματοστατίνης στον καρκίνο προήλθε από την παρατήρηση ότι μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου σε in-vivo μοντέλα με σάρκωμα Karosi που δεν εκφράζουν τους υποδοχείς σωματοστατίνης (SSTR) [431]. Ο υποδοχέας σωματοστατίνης 1 (SSTR1), εκφράζεται έντονα σε αγγεία στα οποία αναστέλλει την ενδοθηλιακή ανάπτυξη, μετανάστευση και νεοαγγείωση [432, 433]. Ο υποδοχέας σωματοστατίνης 3 έχει φανεί να υπό-ρυθμίζει την έκφραση του αγγειακού-ενδοθηλιακού-αυξητικού παράγοντα (VEGF), ο οποίος οδηγεί στην εξέλιξη νέων αγγείων στην ανάπτυξη του όγκου σε συνθήκες υποξίας [434].

5.3.2 Ανάλογα σωματοστατίνης

5.3.2.1 Στόχευση ανάλογων-σωματοστατίνης σε μονό-υποδοχέα

Η ευρέως ανασταλτικές δράσεις της φυσικής σωματοστατίνης είχαν αναγνωριστεί την δεκαετία του 1970. Παρόλα αυτά η κλινική χρησιμότητα της είχε περιοριστεί λόγω της μικρής ημισείας ζωής (λιγότερο από 3 λεπτά) [435]. Για να υπερπηδήσουμε αυτό το εμπόδιο εξελίχθηκε η συνθετική σωματοστατίνη SMS 201-995 ή οκτρεοτίδη (Sandostatin; Sandoz-Novartis Pharmaceuticals Corp., Basel, Switzerland) [436] και BIM-23014 ή λανρεοτίδη (Somatuline; Biomeasure-Ipsen, Paris, France) [437]. Οι κλινικές εφαρμογές της οκτρεοτίδης ενισχύθηκαν από την ανάπτυξη της φόρμουλας μακράς-δράσης αποδέσμευσης (LAR) το 1997, η οποία χρειάζεται επαναληπτική δόση μια κάθε 28 ημέρες [438]. Η οκτρεοτίδη και λανρεοτίδη χρησιμοποιήθηκαν πρώτα για τη θεραπεία της ακρομεγαλίας και των αδενωμάτων της υπόφυσης που εκκρίνουν θυρεοειδοτρόπο ορμόνη-TSH [439-442]. Σε

καλώς διαφοροποιημένους νευροενδοκρινείς όγκους η οκτρεοτίδη αναστέλλει την έκκριση των νευροενδοκρινών ορμονών όπως είναι η 5- hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), ο κύριος μεταβολίτης της σεροτονίνης, γλυκαγόνης και ινσουλίνης [443-445].

Τα ανάλογα σωματοστατίνης έχουν επιδείξει επαρκή έλεγχο των συμπτωμάτων, σταθερότητα του όγκου, βελτίωση της ποιότητας ζωής στους ασθενείς με NET [444, 446-449]. Σε ασθενείς με midgut NET και συμπτώματα καρκινοειδούς συνδρόμου όπως είναι (flushing, διάρροια, βρογχόσπασμος, καρδιοπάθεια καρκινοειδούς), η οκτρεοτίδη LAR είναι αποτελεσματική στον έλεγχο της διάρροιας των επεισοδίων flushing με αναφερόμενη μείωση στο 42% και στο 84% αντίστοιχα [438].

5.3.2.2 Αντί-πολλαπλασιαστική θεραπεία με ανάλογα-σωματοστατίνης με στόχευση σε μονό-υποδοχέα

Η πρώτη αναφορά για την λανρεοτίδη (BIM-23014), υπογραμμίζει την αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε κυτταρικές σειρές με μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα [437]. Τα ανάλογα σωματοστατίνης επάγουν την συρρίκνωση του όγκου, όταν χορηγηθούν σε ασθενείς με ακρομεγαλία, με τις πιο πολλές μελέτες να δείχνουν 10-25% σημαντική μείωση του όγκου του καρκίνου [450-456]. Μια πρόσφατη μετά-ανάλυση, έδειξε κλινική συσχέτιση της μείωσης του όγκου του καρκίνου σε τουλάχιστον 50% των ασθενών με ακρομεγαλία, που αντιμετωπίστηκαν με οκτρεοτίδη (LAR) και αυτή η αρχική θεραπεία μπορεί να επάγει την συρρίκνωση του όγκου σε περισσότερα από τα δυο-τρίτα των ασθενών [457].

Η θεραπεία με οκτρεοτίδη επάγει επίσης τη συρρίκνωση του όγκου στο ένα-τρίτο των ασθενών με αδένωμα υπόφυσης που εκκρίνουν θυρεοειδοτρόπο ορμόνη [458]. Υπάρχουν συσσωρευμένα στοιχεία που δείχνουν ότι οι καρκίνοι των συμπαγών οργάνων εκφράζουν υποδοχείς σωματοστατίνης SSTRs και εισηγούνται την χρήση των ανάλογων σωματοστατίνης και στην Ογκολογία [459-467] (Πίνακας 3). Παρόλα αυτά και η οκτρεοτίδη και η λανρεοτίδη έχουν αποδειχθεί να είναι κλινικά μη ενεργείς έναντι όγκων συμπαγών οργάνων όπως είναι το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη, παρόλα τα αρχικά υποσχόμενα αποτελέσματα σε προ κλινικές μελέτες [468, 469].

Πίνακας 3. Κατανομή των υποδοχέων σωματοστατίνης στους ανθρωπίνους όγκους. (Ορθοκολικός καρκίνος σε γκρι φόντο). [Από: Hofland and Lamberts (2003), The Endocrine Society].

Tumor type	SSTR subtype (%)									
	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Pituitary tumor										
Somatotroph	44		96		44		5		86	
Lactotroph	84		63		35		6		71	
Non-functioning	38		75		43		13		48	
Corticotroph	56		67		25		0		86	
Neuroendocrine tumor										
Carcinoid	76	88	80	78	43		68		77	
Gastrinoma	79	100	93	100	36		61		93	
Insulinoma	76		81		38		58		57	
Non-functioning ICT	58		88		42		48		50	
Renal cell cancer	85		100		0		50			
Breast cancer	33	52	99	48	38	48	23		18	
Meningioma	46		100		33		50		71	
Glioma	100		100		67		71		57	
Neuroblastoma	0		100		17					
Colorectal cancer	27		87		22		10		46	
MTC	29		79		36		0		64	
Pheochromocytoma	100	80	100	90	73		73		73	

Συμπερασματικά από την ανακάλυψη της σωματοστατίνης εδώ και 30 περίπου χρόνια, υπάρχει η γνώση και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που υπογραμμίζουν την αντιεκκριτική και αντί-πολλαπλασιαστική της δράση.

Οι υποδοχείς SSTR_{1, 2, 3, 5} έχουν την δυναμική να μπλοκάρουν την ανάπτυξη του όγκου αναστέλλοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και επάγοντας την απόπτωση.

Μεγάλου ενδιαφέροντος είναι η έμμεση οδός δράσης αυτών των υποδοχέων, στην αγγειογένεση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αναστέλλοντας την έκκριση των αυξητικών παραγόντων όπως είναι VEGF and IGF-1 και η επίδραση τους στο μικροπεριβάλλον των όγκων. Τα δεδομένα αυτά έχουν προέλθει από πολλαπλές μελέτες που εισηγούνται τη συμπλοκή και αντί-πολλαπλασιαστική δράση των υποδοχέων και καταδεικνύουν τους υποδοχείς σωματοστατίνης σαν ένα σημαντικότερο στόχο στην ανάπτυξη και εξέλιξη φαρμάκων έναντι του καρκίνου.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες τα ανάλογα σωματοστατίνης χαρακτηρίζονται σαν οι στυλοβάτες της θεραπείας των ασθενών με ακρομεγαλία και καρκινοειδούς συνδρόμου.

Περαιτέρω έρευνα έχει αυξήσει την κατανόηση της έκφρασης των ειδικών υποδοχέων σωματοστατίνης εντός των όγκων που πρόσθεσε στην κατανόηση μας τον μηχανισμό

δράσης των ανάλογων σωματοστατίνης. Αυτή η γνώση είναι πολύ σημαντική στην αποσαφήνιση του γεγονότος ότι τα ανάλογα σωματοστατίνης είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία συγκεκριμένων όγκων αλλά και αναποτελεσματικά σε άλλους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1
(In-Vivo Ερευνητικό Πρωτόκολλο)

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΟΡΘΟΥ

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού θεωρήθηκε κλασικά σαν μια οντότητα και ονομάζεται ορθοκολικός καρκίνος (ΟΚΚ), ένας από τους πιο συχνούς καρκίνους στον άνθρωπο και το τρίτο αίτιο θανάτου από καρκίνο. Παρόλα αυτά, πριν από δύο δεκαετίες, ο Bulfill [470] πρότεινε την ύπαρξη δύο ξεχωριστών κατηγοριών ΟΚΚ ανάλογα με την εντόπιση των όγκων, είτε στο κεντρικό (εγγύς) είτε στο περιφερικό (άπω) τμήμα του παχέος εντέρου. Συγκρίνοντας τους παράγοντες κινδύνου του ΟΚΚ, φάνηκε ότι ο διαβήτης τύπου II συσχετίζεται με τους ΟΚΚ του περιφερικού τμήματος στους άνδρες ενώ η χολολιθίαση συσχετίζεται με τους ΟΚΚ του κεντρικού τμήματος στις γυναίκες [471]. Οι ασθενείς με κεντρικού τμήματος όγκο παχέος εντέρου παρουσιάζουν διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης μετάχρονου ΟΚΚ απ' ότι οι ασθενείς με περιφερικού τμήματος όγκο [218]. Έχει επίσης αναφερθεί και υψηλότερη επίπτωση προχωρημένης νόσου στους ασθενείς με κεντρικού τύπου καρκίνο παχέος [472].

Επιπλέον, έχουν ήδη αποδειχθεί πολλαπλές μοριακές διαφορές ανάμεσα στην κεντρική και περιφερική νόσο. Ο βλεννώδης ιστολογικός τύπος είναι πιο συχνός στο κεντρικό παρά στο περιφερικό τμήμα του ΟΚΚ [473]. Δύο μορφές γενετικής αστάθειας έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με ΟΚΚ: χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) και μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) έχει περιγραφεί να εμφανίζεται πιο συχνά στο περιφερικό τμήμα του παχέος εντέρου παρά την MSI που είναι πιο συχνή στους σποραδικούς καρκίνους του κεντρικού τμήματος του παχέος εντέρου [473, 474]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 έχουν συσχετιστεί πιο συχνά με τους καρκίνους του περιφερικού τμήματος του παχέος εντέρου, ενώ οι μεταλλάξεις στο K-RAS είναι πιο συχνές στους καρκίνους του κεντρικού τμήματος του παχέος εντέρου [475]. Αυτά τα διαφορετικά χαρακτηριστικά μπορεί να υποδεικνύουν διαφορετικά γενετικά μονοπάτια της καρκινογένεσης, καθώς υποστηρίζουν την

υπόθεση της ύπαρξης ξεχωριστών μηχανισμών στην εξέλιξη της νεοπλασίας στο κεντρικό και περιφερικό παχύ έντερο, καθώς επίσης πιθανές εφαρμογές για την θεραπευτική τους προσέγγιση. Ως αποτέλεσμα, ο ΟΚΚ έχει εισηγηθεί να διαχωρίζεται σε καρκίνους του κεντρικού τμήματος του παχέος εντέρου, σε καρκίνους περιφερικού τμήματος παχέος εντέρου καθώς και σε καρκίνους ορθού [476].

Η κακοήθης εξαλλαγή κατά την διάρκεια της ανάπτυξής του όγκου του παχέος εντέρου προκύπτει σαν αποτέλεσμα της συσσώρευσης γενετικών μετατροπών ή επιγενετικών τροποποιήσεων στα πλαίσια μιας πολυσταδιακής διαδικασίας που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την ανεξέλεγκτη μιτωτική διέγερση και εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου, σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος [49]. Ανάμεσα σε αυτήν ακριβώς τη διαδικασία μεταλλαγών, η ενεργοποίηση της τελομεράσης παίζει καταλυτικό ρόλο στον καταρράκτη της εξέλιξης του όγκου. Το ανθρώπινο τελομερές λειτουργεί σαν προστατευτική δομή που καλύπτει τα δύο άκρα του χρωματοσώματος και δρα σαν εσωτερικό “ρολόι” της κυτταρικής γήρανσης. Ως εκ τούτου, τα τελομερή περιορίζουν τη δυνατότητα του κυττάρου να πολλαπλασιάζεται επάγοντας τη γήρανση σαν ένα είδος ογκοκατασταλτικού μηχανισμού [477]. Η τελομεράση είναι μια πολυσύνθετη ενζυματική ριβονουκλεοπρωτεΐνη, η οποία δρα σαν αντίστροφη μεταγραφάση και αποτελεί τον μοναδικό θετικό ρυθμιστή του μήκους του τελομερούς. Η ενεργότητα της τελομεράσης αποτελεί τον πιο γενικό μοριακό δείκτη για την αναγνώριση ανθρώπινων καρκίνων, καθώς μπορεί να εκφραστεί στο 85-90% όλων των καρκίνων [478]. Παρόλο που η ενεργότητα της τελομεράσης έχει εντοπιστεί στο 95% των ασθενών με ΟΚΚ, υπάρχουν αρκετές διαφωνίες καθώς δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η έκφραση της στις διάφορες θέσεις του παχέος εντέρου.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εκτιμηθεί η ενεργότητα της τελομεράσης στους καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου και του ορθού και του αντίστοιχου παρακείμενου φυσιολογικού βλεννογόνου, σε ασθενείς με ΟΚΚ. Συγκρίναμε την ενεργότητα της τελομεράσης στους όγκους που εντοπίζονται σε διαφορετικά τμήματα του παχέος εντέρου και αναλύσαμε τη σχέση μεταξύ της ενεργότητας της τελομεράσης και των

κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένης και της επιβίωσης των ασθενών. Μελετήσαμε επίσης το γονίδιο MLH1 ως ένδειξη μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI), το p53 και άλλους βιολογικούς δείκτες οι οποίοι συσχετίστηκαν με την ενεργότητα της τελομεράσης.

6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1 Ασθενείς

Το διάστημα μεταξύ Ιουλίου 2002 και Αυγούστου 2004, έγινε δειγματοληψία ασθενών με επιβεβαιωμένο ΟΚΚ. Η μελέτη εγκρίθηκε από την τοπική επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας καθώς είχε διασφαλιστεί γραπτή συγκατάθεση όλων των συμμετεχόντων ασθενών.

Μετά την εξαίρεση του χειρουργικού παρασκευάσματος κατά τη διάρκεια χειρουργείου έγινε συλλογή 4 μικρών ιστοτεμαχίων από τον καρκίνο και 4 μικρών ιστοτεμαχίων από τον φαινομενικά υγιή παρακείμενο βλεννογόνο του παχέος εντέρου, περίπου 10 εκ. κεντρικότερα του όγκου. Εντός 10λέπτου τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και ακολούθως φυλάχθηκαν σε ψυγείο στους -80°C μέχρι να μελετηθούν περαιτέρω. Το εναπομείναν δείγμα στάλθηκε έπειτα για τακτική παθολογοανατομική εκτίμηση. Μελετήθηκαν επίσης περαιτέρω οι προγνωστικοί δείκτες του όγκου όπως τα γονίδια MLH1, p53, p21, Bcl2, Ki-67 για όλους τους ασθενείς. Οι ασθενείς του δείγματος συνέχισαν να παρακολουθούνται μέχρι τον Απρίλιο του 2011. Όλοι οι ασθενείς παραπεμφθήκαν σε ογκολογικό τμήμα για θεραπεία και παρακολούθηση. Κανένας ασθενής δεν έλαβε προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Εκτιμήθηκε η επιβίωση στο 1 έτος, στο 3ο έτος και στο 5ο έτος, καθώς και η συνολική επιβίωση.

6.2.2 Ενεργότητα τελομεράσης

Η μελέτη της ενεργότητας της τελομεράσης έγινε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) της (Quantitative Telomerase Detection [QTD] kit, US Biomax), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Δείγματα από ιστό (20 ± 2 mg) ξεπλύθηκαν με ορό (phosphate buffer) και ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινο ομογενοποιητή με 1 X lysis buffer. Μετά από 30 λεπτά εμβύθισης σε πάγο, το υλικό φυγοκεντρήθηκε στα 12000g για 30 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο (supernatant) ταχέως καταψύχθηκε και φυλάχθηκε στους -80°C. Χρησιμοποιήσαμε μέρος αυτού του υλικού για να υπολογίσουμε την ολική πρωτεΐνη με το πρωτόκολλο Bradford (Bio-Rad Laboratories) χρησιμοποιώντας την βόεια αλβουμίνη (BSA) ορού σαν σταθερά. Το υπόλοιπο από το εκχύλισμα αραιώθηκε με το lysis buffer ώστε να φτάσει σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Χρησιμοποιήσαμε το αραιωμένο δείγμα σαν πρότυπο για το πρωτόκολλο της (RT-PCR). Υπολογίζοντας την ενίσχυση της φωτεινότητας που προκαλείται από τη δέσμευση της χρώσης SYBG Green I στη διπλή έλικα του DNA, ελέγχθηκε η ακριβής εντόπιση του προϊόντος της PCR. Το master mix της RT-PCR αποτελείται από 12 μL του QTD premix που περιλαμβάνει τους εκκινητές του τελομερούς, 1 μL εκχυλίσματος ιστού, πρότυπα controls και 11.5 μL νερό, ώστε να έχουμε ένα τελικό όγκο 25 μL . Μετά από 20 λεπτά εμβύθισης σε 25°C, τα πρότυπα του τελομερούς έχουν σχηματιστεί προσθέτοντας επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 6 βάσεων στον εκκινητή με την επενέργεια της τελομεράσης. Το μείγμα αυτό θερμάνθηκε στους 90°C για 10 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί η Hotstart DNA polymerase και μετά για 40 κύκλους PCR στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 60°C για 30 δευτερόλεπτα, και στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Για να επιβεβαιώσουμε την ειδικότητα και την ταυτότητα των προϊόντων της PCR, η αντίδραση ολοκληρώθηκε χρησιμοποιώντας ανάλυση καμπύλων τήξης (melt-curve analysis), στην οποία η θερμοκρασία αυξήθηκε από 55°C στους 95°C με γραμμικό ρυθμό των 0.2°C/δευτερόλεπτο. Η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια του "annealing" και της επιμήκυνσης με δύο μετρήσεις σε κάθε στάδιο και σε όλες τις χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια του melt curve analysis. Μεταφέραμε όλα τα PCR πειράματα στον θερμικό κυκλοποιητή Mx3000P και τα αναλύσαμε χρησιμοποιώντας το

λογισμικό Version 2.00 (Stratagene). Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της τελομεράσης χρησιμοποιήσαμε ένα θετικό control (TSR template control), ώστε να παραχθεί η πρότυπη καμπύλη (Standard curve) την οποία αποτελούσαν 8 σειριακές αραιώσεις που κυμαίνονταν από 0.5 μg/μL (300.000 μόρια/αντίδραση) έως 6.4×10^{-6} μg/μL. Την ανάλυση κάθε δείγματος αποτελούσαν 2 πρωτόκολλα: ένα με το εκχύλισμα του δείγματος και ένα με το θερμαινόμενο εκχύλισμα δείγματος (heat-treated sample), το οποίο θα είναι το αρνητικό control αφού η τελομεράση είναι θερμοευαίσθητο ένζυμο. Τα controls δείγματα επωάστηκαν στους 85°C για 10 λεπτά πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου της τελομεράσης. Για να ρυθμιστούν τα controls για μωσαϊκισμό, αναλύθηκαν όλα τα τέσσερα δείγματα από 5 διαφορετικούς ασθενείς στην αρχική φάση της μελέτης. Εφόσον δεν ανευρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα για την τελομεράση, προχωρήσαμε στην ανάλυση ενός μόνο δείγματος (καρκίνος και φυσιολογικός ιστός) σε κάθε ασθενή.

6.2.3 Παθολογία

Για κάθε ξεχωριστό ασθενή επιλέξαμε ένα block παραφίνης με καρκινικό ιστό για την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων MLH1, Ki-67, p53, και p21. Χρησιμοποιήσαμε 4μm τομές από blocks παραφίνης καρκινικών ιστών. Εν συνεχεία, πραγματοποιήσαμε χρώση με άνοσο υπεροξειδάση σε τρία στάδια χρησιμοποιώντας το Dako kit. Αρχικά, τα δείγματα αποπαραφινώθηκαν με ξυλόζη και επανα-υδατώθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλκοόλης. Η ενδογενής υπεροξειδάση αναστάληκε χρησιμοποιώντας υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) 0.3% σε Tris buffer (pH 7.60) για 15 λεπτά. Πριν από την επίδραση του πρωτογενούς αντισώματος, οι τομές εμβυθίστηκαν σε 10nM διαλύματος citrate buffer, ξεπλύθηκαν σε Tris-buffered saline (TBS) και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (650-800W) για 30 λεπτά. Για να αποφύγουμε τους μη ειδικούς δεσμούς, οι τομές ξεπλύθηκαν με TBS πριν την επίδραση του πρωτογενούς αντισώματος: antihuman MutL protein homologue-1 (MLH-1), clone E 505 (ready for use, Dako), anti-Ki-67 (MIB-1Ab, dilution 1:80 Dako), anti-p53 (DO-7, dilution 1:100 Biogenex), anti p21 (dilution 1:40 Dako) and anti-Bcl2 (dilution 1:10, Biogenex). Οι όγκοι με γνωστά επίπεδα έκφρασης

Ki-67, p53 and p21, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικά controls, καθώς γνωστός λεμφαδένας εξυπηρέτησε τον ίδιο σκοπό για το γονίδιο Bcl-2. Προ ευαισθητοποιημένος ορός κονίκλου χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό control για να ελεγχθούν οι μη ειδικές χρώσεις.

Δύο ανεξάρτητοι και «τυφλοί» ως προς τις κλινικές πληροφορίες παθολογοανατόμοι, υπολόγισαν την ανοσο-αντίδραση, προσδιορίζοντας την εκατοστιαία αναλογία των θετικά κεχρωσμένων καρκινικών κυττάρων. Οι διαφορές επιλύθηκαν με κοινή συναίνεση. Συγκεκριμένα, η έκφραση του MLH-1, χαρακτηρίστηκε ως θετική όταν ποσοστό 10% των κυττάρων ευρίσκονταν θετικά. Η έκφραση του Ki-67 χαρακτηρίστηκε ως χαμηλή εάν ποσοστό μικρότερο από 20% των κυττάρων ευρίσκονταν θετικά, μέτρια αν 20-50% ευρίσκονταν θετικά και υψηλή αν περισσότερα από 50% των κυττάρων ευρίσκονταν θετικά. Κατηγοριοποιήσαμε την έκφραση των γονιδίων p53, & p21 ως αρνητική αν <5% των κυττάρων ήταν θετικά, χαμηλή αν 5-30% των κυττάρων ήταν θετικά, μέτρια αν 31-60% των κυττάρων ήταν θετικά και υψηλή αν περισσότερο από το 60% των κυττάρων ήταν θετικά. Η ανοσοαντίδραση για το Bcl-2 υπολογίστηκε με βάση την εκατοστιαία αναλογία των καρκινικών κυττάρων με θετική κυτταροπλασματική χρώση. Χρησιμοποιήσαμε σαν κατώτατο όριο το 5% των θετικών καρκινικών κυττάρων, κάτω του οποίου χαρακτηρίζονται ως αρνητικά περιστατικά. Έντονη θετική χρώση εμφανίζεται σε διηθημένα λεμφοκύτταρα εντός του στρώματος του καρκίνου.

Η επιλογή των κατωτάτων ορίων για κάθε ξεχωριστό δείκτη βασίστηκε σε αντίστοιχη κατηγοριοποίηση από άλλες μελέτες. Η επιλογή των ουδών είχε προηγουμένως βρεθεί να χαρακτηρίζει καλύτερες προγνωστικές κλινικοπαθολογικές και μοριακές συσχετίσεις των υπό εξέταση δεικτών [170, 186, 223].

6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πακέτο IBM SPSS statistics Software Version 19. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm σταθερή απόκλιση (mean \pm standard errors).

Αναλόγως της εφαρμοσιμότητας χρησιμοποιήθηκαν: t-test (paired & unpaired) και 1-way analysis των διαφωνιών με (Bonferroni post hoc διόρθωση). Πραγματοποιήσαμε χ^2 - test για την ανάλυση των μη παραμετρικών δεδομένων σε πίνακες 2X2. Επίσης, η συνολική επιβίωση των ασθενών μελετήθηκε χρησιμοποιώντας καμπύλες Kaplan–Meier. Χρησιμοποιήσαμε τα test συσχέτισεων κατά Pearson και Spearman όταν αυτές ήταν εφαρμόσιμες για την περαιτέρω ανάλυση τους.

6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.4.1 Ασθενείς

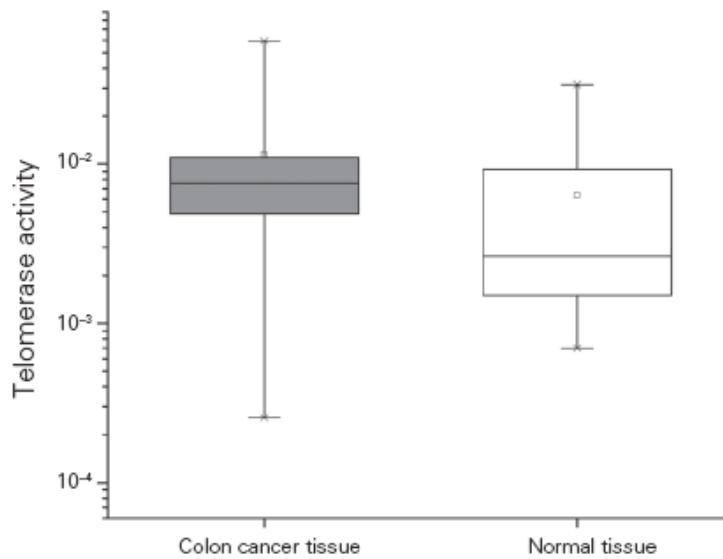
Συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας 49 ασθενείς (21 γυναίκες) με διάμεση ηλικία 74 (όρια 49-87) χρόνια με ΟΚΚ και με βιοψία προεγχειρητικά η οποία ήταν ιστολογικά επιβεβαιωμένη. Τα δημογραφικά, κλινικά, και παθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον (Πίνακα 4). Δώδεκα ασθενείς δεν συμπεριλήφθηκαν γιατί «χάθηκαν» κατά την διάρκεια του follow-up. Για τους υπόλοιπους 37 ασθενείς, αξιολογήσαμε την επιβίωση τους μετά από 1, 3 και 5 χρόνια αλλά και η ολική επιβίωση.

Πίνακας 4. Δημογραφικά, κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών

Characteristic	No.
Patients	
Cancer tissues	49
Adjacent normal tissues	49
Sex	
Male	28
Female	21
Smoking	
Yes	12
No	34
BMI	
< 25	21
≥ 25	25
Dukes staging system	
B	25
C	19
D	5
Histology grade	
High	4
Medium	41
Low	4
Tumour location	
Right colon	8
Left colon	24
Rectum	17
BMI = body mass index.	

6.4.2 Ενεργότητα της τελομεράσης σε καρκίνο συγκρινόμενη με τον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό

Αναγνωρίσαμε την ενεργότητα της τελομεράσης σε όλους τους καρκινικούς ιστούς αλλά και σε όλους τους παρακείμενους φυσιολογικούς βλεννογονικούς ιστούς. Η μέση τιμή της ενεργότητας της τελομεράσης ήταν στατιστικά υψηλότερη στα δείγματα ιστών με ΟΚΚ παρά στα αντίστοιχα δείγματα με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (1.14×10^{-2} copies/μg πρωτεΐνης vs. 0.64×10^{-2} copies/μg, $p=0.006$) (Σχήμα 27).



Σχήμα 27. Ενεργότητα τελομεράσης σε δείγματα καρκινικών ιστών με τον αντίστοιχο παρακείμενο φυσιολογικό ιστό σε ασθενείς με ΟΚΚ (οριζόντια γραμμή=διάμεσος, τετράγωνο=μέσος, όρια:1%-99%).

Το 83% των ορθοκολικών καρκινικών δειγμάτων βρέθηκε να εκφράζει περισσότερη ενεργότητα τελομεράσης, ενώ μόνο το 17% των δειγμάτων αυτών εξέφραζε χαμηλότερη ενεργότητα τελομεράσης συγκριτικά με τους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Ενδιαφέρον είχε ότι μόνο το 57% των ασθενών των οποίων τα καρκινικά δείγματα εξέφραζαν λιγότερη ενεργότητα τελομεράσης από τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς παρουσίαζαν έλλειψη της έκφρασης του MLH-1, ενώ το 35% των ασθενών των οποίων τα καρκινικά δείγματα ιστού εξέφραζαν υψηλότερη ενεργότητα τελομεράσης παρουσίαζαν έλλειψη του MLH-1. Παρόλα αυτά οι αριθμοί είναι πολύ μικροί για να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

6.4.3 Ενεργότητα τελομεράσης και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

Όταν αναλύθηκε η σχέση μεταξύ των κλινικοπαθολογικών παραγόντων και του επιπέδου έκφρασης της ενεργότητας της τελομεράσης, δε βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά σε σχέση με το φύλο, την ηλικία, το κάπνισμα, τον δείκτη μάζας σώματος και το ιστολογικό στάδιο (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Συσχέτιση μεταξύ έκφρασης τελομεράσης & κλινικοπαθολογικών παραμέτρων ασθενών

Variable	Normal mucosa			Cancer tissue		
	No.	Mean ± SD	p value	No.	Mean ± SD	p value
Sex			0.52			0.66
Male	28	0.0126 ± 0.0037		28	0.0055 ± 0.0014	
Female	21	0.0105 ± 0.0029		21	0.0070 ± 0.0019	
Smoke			0.88			0.72
Yes	19	0.0118 ± 0.0026		19	0.0066 ± 0.0017	
No	30	0.0126 ± 0.0060		30	0.0055 ± 0.0019	
BMI			0.09			0.34
< 25	22	0.0073 ± 0.0012		22	0.0052 ± 0.0011	
≥ 25	27	0.0151 ± 0.0040		27	0.0075 ± 0.0021	
Dukes stage			0.57			0.011
A	0	—		0	—	
B	25	0.0140 ± 0.0039		25	0.0104 ± 0.023	
C	19	0.0095 ± 0.0035		19	0.0040 ± 0.0012	
D	5	0.0098 ± 0.0010		5	0.0024 ± 0.0008	
A+B	25	0.0140 ± 0.0039	0.34	25	0.0103 ± 0.0024	0.005
C+D	24	0.00096 ± 0.0028		24	0.0037 ± 0.0044	
TNM stage						
I	6	0.0027 ± 0.0009		6	0.0047 ± 0.0016	
II	19	0.0114 ± 0.0021		19	0.0155 ± 0.0035	
III	18	0.0040 ± 0.0012		18	0.0106 ± 0.0035	
IV	6	0.0034 ± 0.0010		6	0.0081 ± 0.0017	
I-II	25	0.0097 ± 0.0018	0.029	25	0.0133 ± 0.0028	0.18
III-IV	24	0.0038 ± 0.0009		24	0.0099 ± 0.0026	
Grade			0.89			0.21
Low	4	0.0096 ± 0.0039		4	0.0123 ± 0.0045	
Moderate	41	0.0120 ± 0.0028		41	0.0057 ± 0.0013	
High	4	0.0088 ± 0.0018		4	0.0045 ± 0.0024	
Tumour site			0.09			0.20
Right	8	0.0209 ± 0.089		8	0.0101 ± 0.0036	
Left	7	0.0092 ± 0.0015		7	0.0081 ± 0.0032	
Sigmoid	16	0.0133 ± 0.0040		16	0.0054 ± 0.0016	
Rectum	18	0.0053 ± 0.0012		18	0.0034 ± 0.0012	
Total*	49	0.0114 ± 0.0023		49	0.0064 ± 0.0012	
Right colon	15	0.0151 ± 0.0046	0.09	15	0.0092 ± 0.0024	0.043
Left colon	34	0.0089 ± 0.0092		34	0.0043 ± 0.0010	
Colon	31	0.0144 ± 0.0032	0.012	31	0.0078 ± 0.0016	0.035
Rectum	18	0.0053 ± 0.0012		18	0.0034 ± 0.0012	
Right colon	8	0.0209 ± 0.0089	0.047	8	0.0101 ± 0.0036	0.13
Left colon	23	0.0115 ± 0.0023		23	0.0066 ± 0.0016	
Rectum	18	0.0053 ± 0.0012		18	0.0033 ± 0.0012	
Ki-67 expression			0.022			0.66
Negative	3	0.0033 ± 0.0018		—	0.0050 ± 0.0025	
Positive	46	0.0119 ± 0.0024		—	0.0065 ± 0.0013	
p53 expression			0.12			0.037
Negative	16	0.0173 ± 0.0058		—	0.0103 ± 0.0033	
Positive	33	0.0093 ± 0.0022		—	0.0048 ± 0.0010	

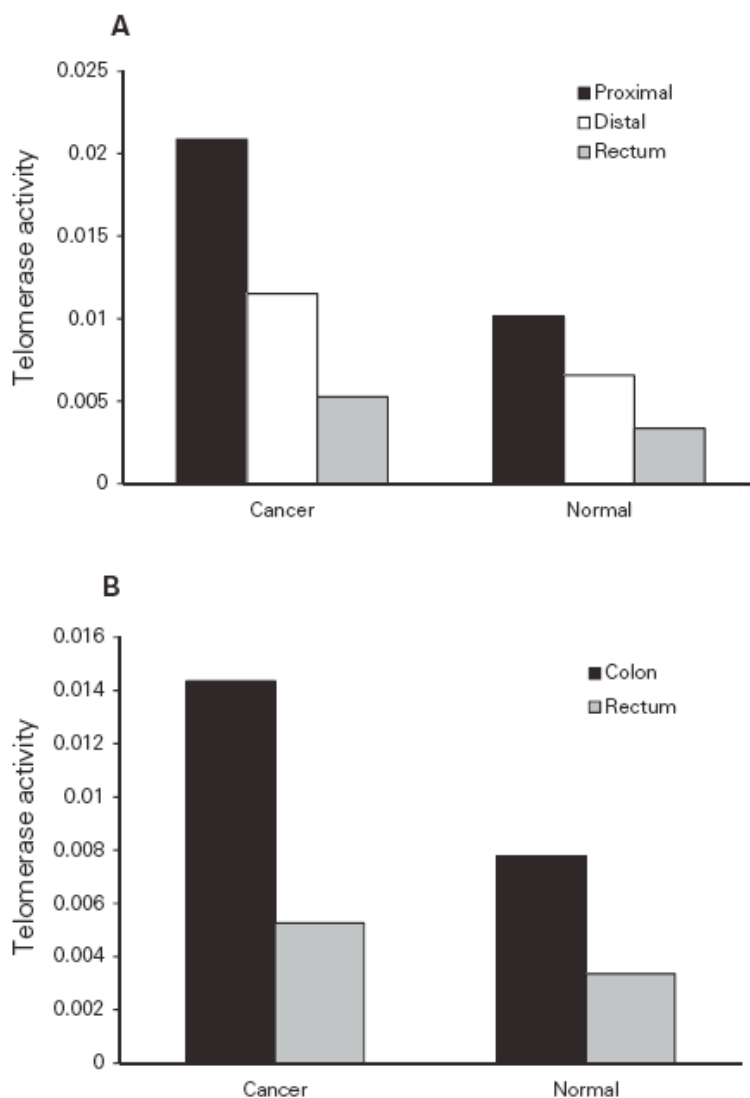
BMI = body mass index; SD = standard deviation; TNM = tumour-node-metastasis.
*p = 0.006 for cancer versus normal p value.

Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι ο παρακείμενος φυσιολογικός ιστός των κατά Dukes A/B καρκίνων, είχε σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα τελομεράσης από τον παρακείμενο φυσιολογικός ιστό των κατά Dukes C/D καρκίνων ($p=0.005$). Παρόμοιο αποτέλεσμα βρέθηκε όταν οι καρκίνοι κατηγοριοποιήθηκαν με το σύστημα TNM, στο οποίο ο παρακείμενος φυσιολογικός ιστός των σταδίου I/II καρκίνων είχε υψηλότερη ενεργότητα τελομεράσης από ότι ο παρακείμενος φυσιολογικός ιστός των σταδίου III/IV καρκίνων ($p=0.029$).

Ο Πίνακας 5 δείχνει τη σχέση μεταξύ του επιπέδου έκφρασης της ενεργότητας της τελομεράσης και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων για τους ασθενείς με ΟΚΚ.

Όταν οι καρκίνοι ταξινομήθηκαν σε αυτούς του δεξιού κόλου, (τυφλό, ανιόν, εγκάρσιο) και σε αριστερού κόλου (σπληνική καμπή, κατιόν, σιγμοειδές) και σε καρκίνους του ορθού, παρατηρήσαμε μια σταδιακή μείωση της ενεργότητας της hTERT (Σχήμα 28A), με τους καρκίνους του ορθού να έχουν την χαμηλότερη ενεργότητα hTERT η οποία διέφερε σημαντικά από τους εγγύς καρκίνους ($p=0,006$).

Τέλος, όταν έγινε ταξινόμηση στους καρκίνους παχέος εντέρου και στους καρκίνους ορθού, παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση του επιπέδου της ενεργότητας της τελομεράσης στους καρκίνους παχέος εντέρου συγκριτικά με αυτούς του ορθού ($p=0.012$). Ακριβώς η ίδια αύξηση παρατηρήθηκε στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου συγκριτικά με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο ορθού ($p = 0.035$, Σχήμα 28B).



Σχήμα 28. (A) Ενεργότητα τελομεράσης μεταξύ καρκίνου δεξιού κόλου (τυφλό, ανιόν, εγκάρσιο), αριστερού κόλου (σπληνική καμπή, κατιόν, σιγμοειδές), ορθού με τον αντίστοιχο παρακείμενο φυσιολογικό βλεννογόνο. **(B)** Σύγκριση της ενεργότητας της τελομεράσης ανάμεσα στους καρκίνους του παχέος εντέρου και του ορθού και στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. ($p = 0.012$ για τους καρκίνους στο παχύ ν. ορθό, και $p = 0.035$ για τους παρακείμενους φυσιολογικούς στους στο παχύ ν. στο ορθό). Αποτελέσματα είναι μέσος όρος \pm Standard errors

Βρήκαμε ότι οι p53-αρνητικοί όγκοι είχαν υψηλότερη ενεργότητα τελομεράσης συγκριτικά με τους p53-θετικούς όγκους, παρόλο που αυτό το αποτέλεσμα έδειχνε μια τάση μόνο προς στατιστική σημαντικότητα (0.0173 ± 0.058 vs. 0.0093 ± 0.0022 Telomerase activity copies, $p = 0.06$). Ενδιαφέρον είχε ότι η έκφραση του p53 στους καρκινικούς ιστούς συσχετίστηκε αρνητικά με την ενεργότητα της τελομεράσης στους παρακείμενους

φυσιολογικούς ιστούς ($p = 0.003$). Επιπλέον οι καρκίνοι του παχέος εντέρου ήταν p53 θετικοί σε ένα ποσοστό 56.3%, ενώ οι καρκίνοι του ορθού ήταν θετικοί σε μεγαλύτερο ποσοστό για p53 (88.2%, $\chi^2 = 5.165$, $p = 0.023$).

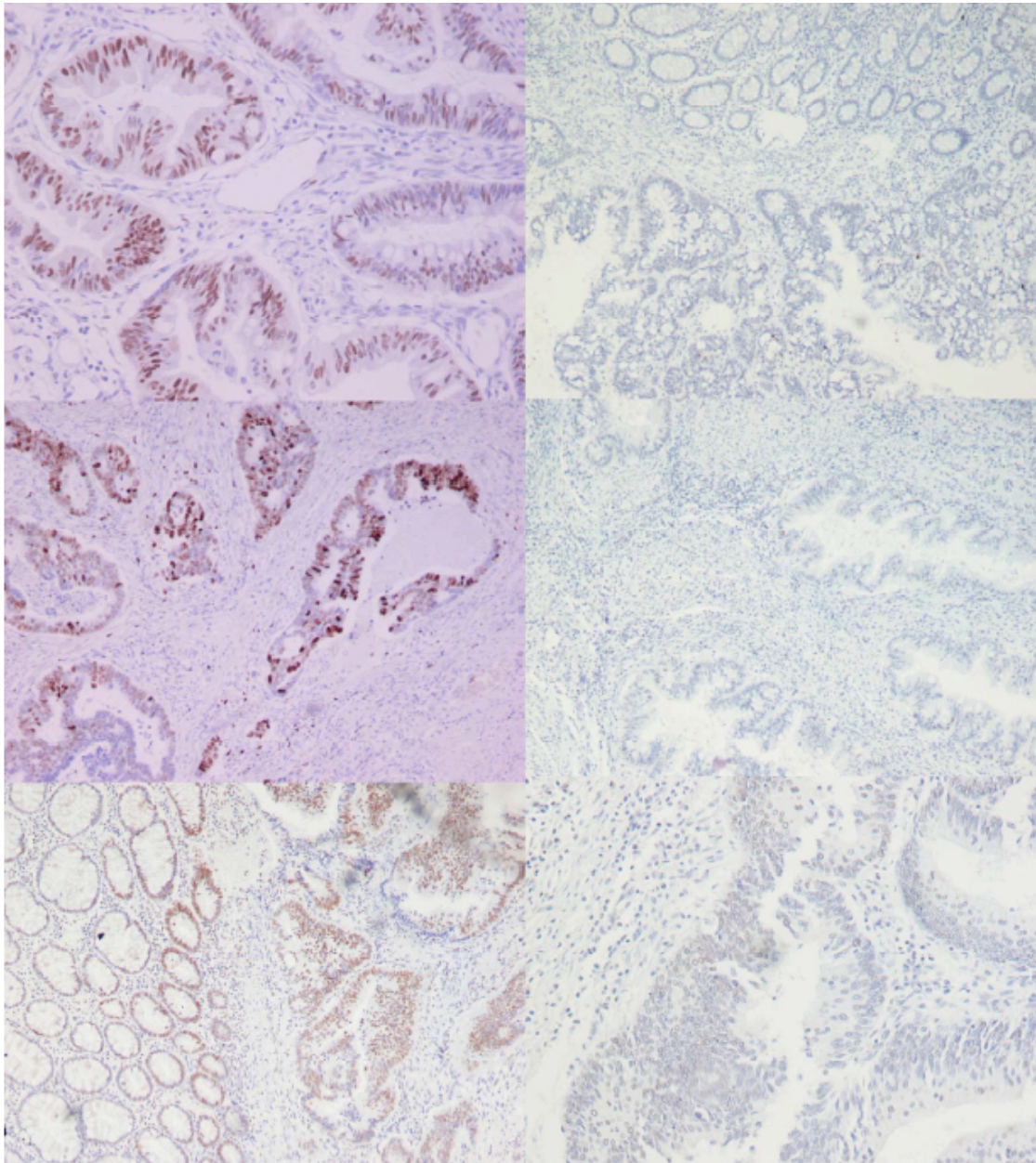
Τυπικά η ανοσοϊστοχημική χρώση φαίνεται στο (Σχήμα 29). Δεν υπήρχε καμία συσχέτιση ανάμεσα στην ενεργότητα της τελομεράσης ή την εντόπιση του όγκου σε σχέση με την έκφραση των δεικτών Ki-67, Bcl-2 ή p21 (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα Ανοσοϊστοχημείας για το p53, Bcl2, Ki-67 και p21 σε ιστούς από καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού

Marker	Group; positive tissues, no. (%)		p value
	Colon cancer, <i>n</i> = 32	Rectal cancer, <i>n</i> = 17	
p53	18 (56.3)	15 (88.2)	0.023
bcl2	7 (21.9)	6 (35.3)	0.25
Ki-67	29 (90.6)	17 (100)	0.27
p21	17 (53.1)	10 (58.8)	0.47

6.4.4 Μικροδορυφορική αστάθεια (MSI)

Δεκαοκτώ ασθενείς δεν εξέφραζαν MLH-1, ενδεικτικό μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI). Δεν υπήρχε στατιστική διαφορά όσον αφορά το επίπεδο της τελομεράσης ανάμεσα στα MLH-1 θετικά και αρνητικά δείγματα ιστών (Πίνακας 7). Επιπλέον, δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έλλειψη του MLH-1 και στην ηλικία, φύλο και κάπνισμα. Ανάμεσα στα δείγματα ιστού με καρκίνο παχέος εντέρου μόνο τα 8 από τα 32 (25%) παρουσίασαν έλλειψη του MLH-1, ενώ στα δείγματα ιστού με καρκίνο ορθού έλλειψη του MLH-1 έδειξαν οι 10 από τους 17 ασθενείς (59%, $p = 0.029$). Δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του MLH-1 και στην έκφραση των p53, p21 και Bcl2 στα δείγματα όγκου. Υπήρχε όμως συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του MLH-1 και στα υψηλά επίπεδα Ki-67.



Σχήμα 29. Παρασκευάσματα από ΟΚΚ με τυπική εικόνα στην άνοσο χρώση (άνω αριστερά), έντονα θετική ανοσοαντίδραση για πυρηνικό p53 ($\times 200$) συγκριτικά με αρνητικό για καρκίνο όγκο (άνω δεξιά). (Μέσο αριστερά) Θετική ανοσοαντίδραση για πυρηνικό p21 ($\times 200$) συγκριτικά με αρνητικό δείγμα (Μέσο δεξιά). (Κάτω αριστερά) Θετική ανοσοαντίδραση για MLH1 ($\times 200$) συγκριτικά με αρνητικό δείγμα (κάτω δεξιά).

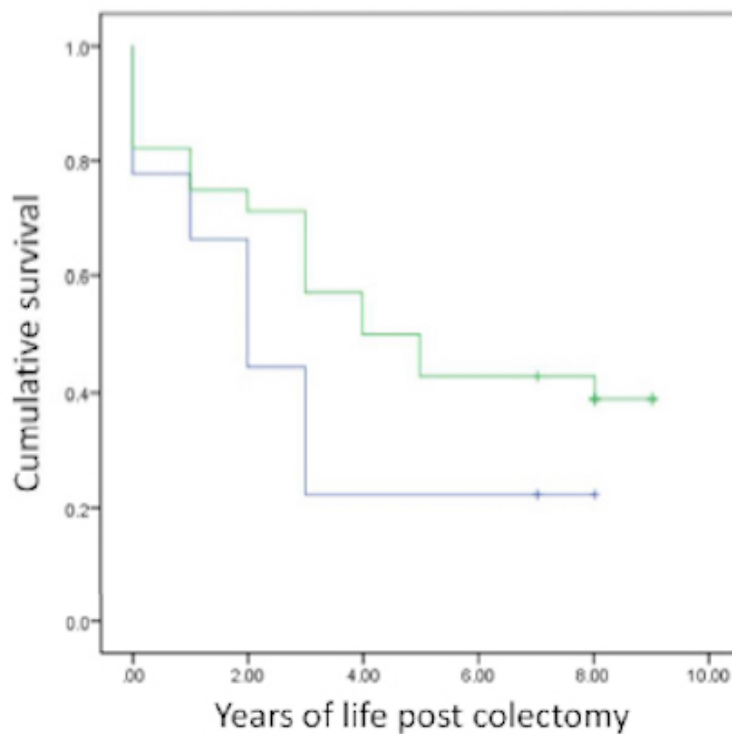
Πίνακας 7. Σύγκριση της έκφρασης του MLH1 με την ενεργότητα της τελομεράσης και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά σε ασθενείς με ΟΚΚ

Factor	MLH1, negative	MLH1, positive	<i>p</i> value
Telomerase activity	0.0125 ± 0.0028	0.0088 ± 0.0039	0.47
Age, yr	71.71	70.28	0.62
Sex			0.45
Male	11	17	
Female	7	11	
Smoke			0.69
Yes	3	9	
No	14	22	
Duke stage			0.048*
A	—	—	
B	13	12	
C	5	14	
D	1	4	
TNM stage			0.019†
I	4	2	
II	9	10	
III	4	14	
IV	1	5	
Tumour site			0.09
Right	1	7	
Left	3	5	
Sigmoid	4	12	
Rectum	10	7	
Proximal	4	12	0.12
Distal	14	19	
Colon	8	24	0.029
Rectum	10	7	
Right	1	7	0.046
Left	7	17	
Rectum	10	7	
p53 expression			0.34
Positive	12	22	
Negative	6	8	
bcl2 expression			0.57
Positive	5	8	
Negative	14	22	
Ki-67 expression			0.033‡
Low	4	3	
Moderate	9	8	
High	5	18	
p21 expression			0.40
Positive	9	17	
Negative	9	14	
TNM = tumour-node-metastasis. * χ^2 test for trend $p < 0.05$; the group had fewer than 5 patients. † χ^2 test for trend $p < 0.02$; the group had fewer than 5 patients. ‡ χ^2 test for trend $p = 0.033$; the group had fewer than 5 patients.			

6.4.5 Συσχετίσεις με επίπεδο επιβίωσης

Στη δική μας μελέτη οι επιβιώσεις 1-, 3- και 5- χρόνων ήταν 85.7%, 65.3% και 55.1% αντίστοιχα. Δεν υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στην τελομεράση και στην επιβίωση γενικά. Υπήρξε παρόλα αυτά μια τάση προς θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του p53 και της επιβίωσης (Σχήμα 30). Οι p53 θετικοί ασθενείς τείνουν να ζουν περισσότερο κατά μέσο όρο 5.0 χρόνια (95% confidence interval [CI] 3.7-6.4), καθώς οι p53 αρνητικοί ασθενείς υπολογίζεται να ζουν κατά μέσο όρο 3.0 χρόνια (95% CI 1.1-4.9). Δε θεωρούμε αυτά τα αποτελέσματα σημαντικά λόγω του μικρού δείγματος ασθενών σε κάθε ομάδα.

Δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των Bcl-2, p21, Ki-67, MLH-1 και στην επιβίωση των ασθενών.



Σχήμα 30. Kaplan–Meier plot, με την επιβίωση των ασθενών με p53-θετικούς όγκους (πράσινη γραμμή) and p53-αρνητικούς όγκους (μπλε γραμμή).

6.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να προσδιορίσει τον ρόλο των επιπέδων ενεργότητας της τελομεράσης στην πρόγνωση των ασθενών με ΟΚΚ καθώς και στην διαφορετική τοπογραφία του καρκίνου. Επίσης σκοπός ήταν να αναγνωρίσει άλλα κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με τα επίπεδα της τελομεράσης. Αποδείξαμε ότι η ενεργότητα της τελομεράσης αυξάνεται στους καρκίνους του παχέος εντέρου συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς και επίσης δείξαμε ότι υπάρχει διαφορά ανάμεσα στους καρκίνους του δεξιού κόλου με αυτούς στο αριστερό κόλο. Επιπλέον υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην τελομεράση και στην έκφραση του γονιδίου p53. Παρόλο που η τελομεράση δε συσχετίστηκε με την επιβίωση των ασθενών, η έκφραση του p53 στους καρκίνους του παχέος εντέρου συνδέθηκε με αύξηση της επιβίωσης των ασθενών.

Το τελομερές είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA βάσεων “TTAGGG” στο τέλος κάθε χρωματοσώματος, τα οποία είναι σημαντικά για την διασφάλιση της πλήρους αντιγραφής του χρωματοσώματος και για την προστασία των χρωμοσωμικών άκρων από την σύντηξη μεταξύ τους και την καταστροφή τους [479]. Μετά από ένα πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών πολλαπλασιασμών, το τελομερές μικραίνει έως ότου φτάσει ένα κρίσιμο μήκος (το σημείο γήρανσης), και τότε είτε διακόπτεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, είτε επέρχεται απόπτωση και κυτταρικός θάνατος (φυσιολογική γήρανση). Παρόλα αυτά, εάν καταφέρει το κύτταρο να αποφύγει αυτό το κρίσιμο σημείο τότε επισυμβαίνει είτε χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal instability - CIN), είτε σύντηξη των χρωμοσωμικών τελών η οποία μπορεί να συμβάλει στον κυτταρικό θάνατο ή την καρκινογένεση [480].

Το μήκος του τελομερούς συνήθως διατηρείται από ένα ένζυμο την τελομεράση. Το σύμπλεγμα της τελομεράσης αποτελείται από την hTERT, την συσχετιζόμενη με την τελομεράση πρωτεΐνη [Telomerase Associate protein (TP1)] και το RNA πρότυπο για τη σύνθεση του τελομερικού DNA (hTR) [481-483]. Η hTERT θεωρείται ότι αντανάκλα στην ενεργότητα της τελομεράσης και στο μήκος του τελομερούς. Το μήκος του τελομερούς και η έκφραση της hTERT, συμπίπτουν σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου

[484, 485]. Ωστόσο η ενεργότητα της τελομεράσης δε συμπίπτει πάντα με το hTERT στους καρκίνους του παχέος εντέρου [486], πιθανότατα λόγω της παρουσίας της hTERT στα διηθημένα λεμφοκύτταρα στο φυσιολογικό ιστό. Οπότε η μέτρηση μόνο της hTERT μπορεί να υπερεκτιμήσει την πραγματική παρουσία της τελομεράσης στα φυσιολογικά και στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα [487].

Οι αναφορές όσον αφορά την έκφραση της τελομεράσης στους φυσιολογικούς (μη-καρκινικούς ιστούς) είναι αντιφατικές. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα της τελομεράσης στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα είναι ανύπαρκτη [480] και ότι είναι ιδιαίτερα αυξημένη σχεδόν σε όλους τους καρκίνους αλλά όχι και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, στον άνθρωπο [488, 489]. Άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι η ενεργότητα της τελομεράσης είναι σταθερά παρούσα σε όλους τους φυσιολογικούς ιστούς στον άνθρωπο και μπορεί να θεωρηθεί σαν δείκτης για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [490-492].

Τα αποτελέσματα είναι επίσης συγκρουόμενα και όσον αφορά το παχύ έντερο. Υπάρχουν μελέτες που δεν βρήκαν hTERT στο φυσιολογικό βλεννογόνο σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, αποτέλεσμα αντίθετο με τα δικά μας [493, 494]. Σε συμφωνία με τη δική μας μελέτη έρχεται ο Nowak και οι συνεργάτες [491], οι οποίοι βρήκαν ενεργότητα τελομεράσης σε φυσιολογικό βλεννογόνο σε απόσταση 5εκ. από τον καρκίνο στο παχύ έντερο και τα επίπεδα της ήταν υψηλότερα από την ενεργότητα τελομεράσης που βρέθηκε σε φυσιολογικό βλεννογόνο παχέος σε απόσταση 10εκ. από τον όγκο. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της παραμονής υπολειπόμενων καρκινικών κυττάρων πλησιέστερα στον όγκο ή επίσης μπορεί να συμβαίνει λόγω της βελτίωσης της ευαισθησίας των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της ενεργότητας της τελομεράσης τα τελευταία χρόνια.

Οι διάφορες αναφορές μελετών για τα επίπεδα της τελομεράσης σε καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς είναι επίσης συγκρουόμενες. Ο καρκινικός ιστός έχει αναφερθεί ότι εκφράζει λιγότερη ενεργότητα τελομεράσης από τον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου [484, 485], ωστόσο σε μια σειρά [495] από 53 ασθενείς με ΟΚΚ και 9 ασθενείς με αδενώματα παχέος εντέρου, οι ασθενείς με καρκίνο είχαν υψηλότερα

επίπεδα hTERT από τους ασθενείς με φυσιολογικό ιστό. Αυτή η μελέτη δεν ανέφερε διαφορές ανάμεσα σε καρκίνο ή αδένωμα [495]. Επιπλέον στη μεγαλύτερη σειρά που δημοσιεύθηκε ως τώρα, η έκφραση του hTERT mRNA ήταν στατιστικά υψηλότερη στους καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με τα αδενώματα και τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς 140 ασθενών [496]. Περισσότερη επιβεβαίωση έρχεται από μελέτες σε ασθενείς με υψηλή επικινδυνότητα για ΟΚΚ λόγω χρόνιας φλεγμονώδους εντεροπάθειας [497, 498]. Ιδιαίτερα στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, η υπερέκφραση του hTERT έχει συνδεθεί με την επαγωγή της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN) [498], πιθανότατα λόγω οξειδωτικού stress και καταστροφής, συνεπεία φλεγμονής [499]. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με τις πιο πάνω μελέτες, αφού βρέθηκε ότι η ενεργότητα της τελομεράσης υπάρχει σε όλα τα δείγματα φυσιολογικού ιστού, παχέος εντέρου και ορθού καθώς επίσης και στα καρκινικά δείγματα ιστών. Δυστυχώς δεν είχαμε δείγματα από αδενώματα παχέος εντέρου τα οποία θα έριχναν φως στις διαφορές της ενεργότητας της τελομεράσης και την έκφραση του MLH1 στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης του ΟΚΚ.

Προσφάτως ο Rampazzo και οι συνεργάτες του [477] μελέτησαν την συσχέτιση ανάμεσα στην βράχυνση του τελομερούς, τη γενετική αστάθεια και την εντόπιση του όγκου σε ασθενείς με ΟΚΚ. Βρήκαν ότι το τελομερές είναι σημαντικά βραχύτερο στους ΟΚΚ παρά στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, και ότι το μήκος του τελομερούς δε διαφέρει με την εξέλιξη του όγκου ή με την κατάσταση του p53. Ενδιαφέρον είχε ότι το μήκος του τελομερούς διέφερε ανάλογα με την εντόπιση του όγκου, με τους καρκίνους στο ορθό να έχουν το πιο μακρύ τελομερές. Η έκφραση της τελομεράσης δε διέφερε στις διαφορετικές εντοπίσεις όγκου στο παχύ έντερο και το ορθό. Ο Rampazzo και οι συνεργάτες του όμως δε μελέτησαν ενεργότητα τελομεράσης. Παρόλο που τα αποτελέσματα τους, εν μέρει τουλάχιστον, δείχνουν να διαφέρουν από τα δικά μας και ότι αυτό μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετικότητα του πληθυσμού των ασθενών μας, είναι πιθανόν η ικανότητα της τελομεράσης να επιμηκύνει τα τελομερή να διαφέρει ανάλογα της εντόπισης του ΟΚΚ. Περισσότερες μελέτες θα πρέπει να διερευνήσουν αυτό το φαινόμενο, καθώς θα μπορούσε να δώσει νέες πληροφορίες για τη βιολογία του καρκίνου.

Μια επιπρόσθετη αντιπαράθεση προέκυψε όταν μελετήθηκε η τελομεράση σε συνδυασμό με το στάδιο νόσου και την επιβίωση των ασθενών. Στην μελέτη μας βρήκαμε χαμηλότερη ενεργότητα τελομεράσης στους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο σταδίου κατά Dukes C ή D, συγκριτικά με τους ασθενείς με καρκίνο σταδίου κατά Dukes A ή B. Το ίδιο αποτέλεσμα επαναλήφθηκε όταν οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν βάση του American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system στο οποίο ο παρακείμενος φυσιολογικός ιστός ασθενών με ΟΚΚ σταδίου νόσου III και IV είχαν λιγότερη ενεργότητα τελομεράσης από τους ασθενείς με ΟΚΚ σταδίου I ή II. Τα αποτελέσματα παρόλα αυτά δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Επίσης στη μελέτη μας δε βρέθηκε συσχέτιση της ενεργότητας της τελομεράσης και της 3- ή 5- χρόνια επιβίωσης των ασθενών με χειρουργηθέν ΟΚΚ. Ωστόσο άλλες μελέτες ανέφεραν ότι η ενεργότητα της τελομεράσης τείνει να είναι υψηλότερη στους μεγαλύτερους, λιγότερο διαφοροποιημένους και προχωρημένου σταδίου (Dukes C & D) καρκίνους [500]. Επίσης το Union for International Cancer Control για σταδίου I όγκους έδειξε κοντύτερα τελομερή και χαμηλότερη ενεργότητα τελομεράσης απ' ότι στους σταδίου IV καρκίνους. Σε άλλες σειρές, η έκφραση του hTERT mRNA ταυτίστηκε σημαντικά με το ιστολογικό στάδιο, ώστε οι ασθενείς με υψηλότερες τιμές ενεργότητας τελομεράσης να έχουν λιγότερη επιβίωση απ' ότι οι ασθενείς με χαμηλότερες τιμές [484, 485, 501]. Φτωχότερη επιβίωση σε ασθενείς με υψηλή τελομεράση έχει αναφερθεί και από άλλους, αλλά δεν υπάρχει περαιτέρω συσχέτιση με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους [502]. Μια εξήγηση για όλες αυτές τις διαφορές είναι ότι στο έντερο του ανθρώπου το μήκος του τελομερούς σχετίζεται αντίστροφα με την ηλικία μέχρι τα 60-70 έτη. Πέραν αυτής της ηλικίας το μήκος του τελομερούς σχετίζεται θετικά με τη ηλικία [503]. Ως εκ τούτου εξήγηση γι' αυτές τις διαφορές μεταξύ της δικής μας έρευνας και των άλλων μπορεί να αποτελεί η διαφορετική ηλικία των ασθενών της δικής μας σειράς σε σχέση με την ηλικία των ασθενών σε άλλες μελέτες. Διαφορετικά τα αποτελέσματά μας μπορεί να υπονοούν ότι σε αρχικά στάδια νόσου το φυσιολογικό επιθήλιο του εντέρου μπορεί να είναι πιο ευπαθές σε δημιουργία όγκου μέσω της τελομεράσης, ενώ σε προχωρημένα στάδια νόσου το δυναμικό

αυτό μειώνεται ή μπορεί επίσης να υπάρχει ανεπάρκεια της αναγεννητικής διαδικασίας στο φυσιολογικό ιστό σε προχωρημένη νόσο με καρκίνο εντέρου.

Παρόλο που αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την διαφορετική φύση του παχέος εντέρου και του ορθού, ο ΟΚΚ θεωρείται ακόμα μια σχετικά ομοιογενής νόσος. Ωστόσο, η θεραπεία του καρκίνου στο ορθό διαφοροποιείται εφόσον υπάρχει η ακτινοθεραπεία που ενδείκνυται σε τοπικά προχωρημένη νόσο στο ορθό μόνο. Από μοριακή πλευράς όμως, υπάρχουν μελέτες που επιβεβαιώνουν ότι οι όγκοι με εντόπιση στο εγγύς κόλο αποτελούν ξεχωριστή οντότητα με εξειδικευμένα κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά [476]. Παρόλο που σε πρόσφατη μελέτη από το Cancer Genome Atlas Network, αναφέρθηκε ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού έχουν παρόμοιο πρότυπο γενετικών μεταβολών, το συμπέρασμα αυτό εξάχθηκε μετά τον αποκλεισμό υπέρ-μεταλλαγμένων καρκίνων (ποσοστό 16% των δειγμάτων τους), που συμπεριλάμβανε καρκίνους με υψηλή μικροδορυφόρο αστάθεια συνήθως με υπερμεθυλίωση και σίγαση του γονιδίου MLH1 [504]. Τα δικά μας αποτελέσματα, αν και σε μερική διαφωνία με την μελέτη “Cancer Genome Atlas Network”, είναι χρήσιμα γιατί αντανακλούν δείγματα από καρκίνο σε ασθενείς της καθημερινότητας, από ένα Νοσοκομείο πρώτης γραμμής. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι είναι πιθανόν: α) η υψηλής ενεργότητας τελομεράση, παρέχοντας κυτταρική αθανατοποίηση και β) η χαμηλής ενεργότητας τελομεράση, προάγοντας χρωμοσωμική αστάθεια, να αυξήσουν και οι δύο τον κίνδυνο του καρκίνου [505]. Τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν ότι η υψηλή ενεργότητα της τελομεράσης στο παχύ έντερο συνοδεύεται με ανάπτυξη καρκίνου, ενώ η χαμηλή ενεργότητα της τελομεράσης στο ορθό συνοδεύεται και με αυξημένη απώλεια της έκφρασης του MLH1 σημαίνοντας αυξημένη μικροδορυφόρο αστάθεια. Περαιτέρω μοριακές διαφορές σχετιζόμενες με την εντόπιση του ΟΚΚ περιλαμβάνουν υπερέκφραση του p53 περισσότερο στους αριστερού κόλου καρκίνους έναντι των δεξιού κόλου καρκίνους (43%-60% vs 16%-23%) [477, 506]. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω αποτελέσματα βρίσκεται και η δική μας σειρά στην οποία μόλις οι μισοί από τους καρκίνους του παχέος εντέρου εκφράζουν το p53, ενώ οι καρκίνοι στο ορθό εκφράζουν το p53 σε ποσοστό 88.2%. Η καταστροφή του DNA, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η υποξία, διεγείρουν την συσσώρευση του p53, καθώς και τη

δυνατότητα για αντιγραφή και ενεργοποίηση γονιδίων στόχων περιλαμβάνοντας το Bax [507]. Επίσης καταστέλλει το αντι αποπτωτικό γονίδιο Bcl-2 [508].

Πολλές μελέτες έχουν θέσει το θέμα της αλληλεπίδρασης της τελομεράσης με το p53 και από ότι φαίνεται εξουδετερώνουν το ένα το άλλο. Υπάρχουν αρκετές αναφορές που δείχνουν ότι η ενεργότητα της τελομεράσης αναστέλλεται όταν υπάρχει υπερέκφραση του p53 σε ανθρώπια καρκινικά κύτταρα [508-510]. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι το γονίδιο hTERT καταστέλλεται με την ενεργοποίηση του wild-type p53 [511]. Η απενεργοποίηση του p53 σε κύτταρα μαζικού αδένου οδηγεί σε ενεργοποίηση της τελομεράσης [512], καθώς όμως τα δυσλειτουργούντα τελομερή διεγείρουν αυτά τα κύτταρα σε p53-εξαρτώμενα μονοπάτια για καταστολή της ανάπτυξης [513].

Υπάρχει επίσης απόδειξη ότι το p73 (μέλος της οικογενείας το p53), ρυθμίζει το hTERT καθώς η υπερέκφραση του p73 καταστέλλει το hTERT [514]. Αντίθετα, το hTERT φαίνεται να μειώνει την αντι αποπτωτική δράση του p53, επάγοντας το basic fibroblast growth factor (BFGF) [515]. Έχει επίσης βρεθεί ότι η έκφραση του hTERT, αναστέλλει την απόπτωση που διεγείρεται από το wild-type p53 στα καρκινικά κύτταρα στο παχύ έντερο και αυτό το αποτέλεσμα είναι ανεξάρτητο από την ενεργότητα της τελομεράσης καθώς η ανενεργή τελομεράση συνεπεία μεταλλαγμένου hTERT ήταν το ίδιο αποτελεσματική ανταγωνιζόμενη την αποπτωτική δράση του p53 [516]. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με τις αναφορές που θέλουν το hTERT να μπορεί να προάγει την επιβίωση του κυττάρου ανεξαρτήτως της ενζυματικής του δραστηριότητας [517]. Σε μια μελέτη με 43 ασθενείς με ΟΚΚ, τροποποιήσεις στο p53 βρέθηκαν στο 44.1% των ασθενών και οι μεταλλάξεις στο p53 συσχετιζόνταν θετικά με έκφραση του hTERT [518]. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι καταστολή της τελομεράσης (οπότε κοντά τελομερή) καθώς και απουσία του p53, έχει συσχετιστεί με χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου [519]. Σε πρόσφατη μελέτη, ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα επιδεικνύουν χαμηλή έκφραση p53 και κοντά τελομερή με χαμηλού βαθμού δυσπλασία, καθώς το p53 και το μήκος του τελομερούς αυξάνονταν προοδευτικά με την αυξημένου βαθμού δυσπλασία, επιδεικνύοντας μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των δύο σε αυτές τις προνεοπλασματικές συνθήκες [520]. Όλα αυτά τα ευρήματα

είναι σύμφωνα με τα δικά μας ευρήματα, μιας αντίστροφης δηλαδή σχέσης μεταξύ του p53 και του hTERT σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου.

Τέλος, έχουμε βρει ότι η έκφραση του p53 έχει συσχετιστεί με αυξημένη επιβίωση των ασθενών. Δεν είναι ξεκάθαρο αν υπάρχει σχέση μεταξύ αυτού του ευρήματος και της ενεργότητας της τελομεράσης, καθώς δε βρήκαμε ευθέα συσχέτιση των επιπέδων της ενεργότητας της τελομεράσης με την επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον μελέτες θα χρειαστούν για να διαλευκάνουν τη σημαντικότητα μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης.

6.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα μας υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση της ύπαρξης των πολλαπλών μοριακών οντοτήτων στο ευρύ φάσμα του ΟΚΚ. Οι διαφορές που εμείς και άλλοι [477] έχουμε βρει όσον αφορά την ενεργότητα της τελομεράσης στο καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού, μπορεί να σχετίζεται με την ποικιλομορφία της καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εξέλιξη της νόσου στις διαφορετικές εντοπίσεις του όγκου στο έντερο μπορεί να αποδοθούν στη ξεχωριστή εμβρυολογία, ανατομία, φυσιολογία, και μοριακή βιολογία του κάθε τμήματος του παχέος εντέρου και του ορθού. Επιπρόσθετα θα ήταν ενδιαφέρον να εξετάσουμε αν και με κάποιο τρόπο σχετίζεται η έκφραση του p53 με την απάντηση των ασθενών σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα.

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΗΣ Ε2 (PGE₂) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ 2 (COX-2) ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΙΣΤΟ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΗΝ hTERT.

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και ορθού είναι από τις συχνότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο στις αναπτυγμένες χώρες [521]. Η υψηλή επίπτωση της νόσου καθιστά επιτακτική την κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών που διέπουν την καρκινογένεση του παχέος εντέρου και του ορθού.

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναφέρει 40-50% μείωση του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού σε άτομα που λάμβαναν χρονίως και συστηματικά μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) [522-524], ένδειξη ότι τα φάρμακα αυτά ασκούν χημειοπροστατευτική δράση, αλλά ίσως και χημειοθεραπευτικό αποτέλεσμα. Δεδομένα από μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι τα ΜΣΑΦ μπορεί να μειώσουν τον αριθμό και το μέγεθος πολυπόδων σε ασθενείς με οικογενή πολυποδίαση (FAP) [350, 525].

Τα πιο πολλά ΜΣΑΦ που χρησιμοποιούνται σήμερα, αναστέλλουν την δράση της COX, ενός ενζύμου που εμπλέκεται στην παραγωγή των προσταγλανδινών (PGs). Οι κυκλοξυγενάσες είναι ενδοκυττάρια ένζυμα που καταλύουν την μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες και άλλα εικοσανοειδή. Δύο κύριες ισομορφές του COX γονιδίου έχουν εντοπιστεί, το συνιστάμενα εκφραζόμενο COX-1 ένζυμο και το επαγόμενο COX-2 ένζυμο. Θεωρείται ότι το COX-1 εκφράζεται σε σχεδόν όλους τους ιστούς με χαρακτήρα διοικητικού ενζύμου. Ενώ αντίθετα το COX-2 είναι προϊόν ταχέως επαγόμενο και ρυθμιζόμενο. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση της COX-2 περιορίζεται σε συγκεκριμένα όργανα όπως είναι το ΚΝΣ [526, 527], ο νεφρός [329], ο οφθαλμός [528]. Η έκφραση όμως της COX-2 μπορεί να αυξηθεί δραματικά σε ιστούς ακολουθώντας αντιγραφή,

ενεργοποιώντας παράγοντες όπως προ φλεγμονώδεις κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες ή εκκινητές όγκων [529]. Η έκφραση της COX-2 είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε δείγματα όγκων ασθενών με ΟΚΚ. Αναστολή της ενεργότητας της COX-2 θεωρείται ότι αφορά την χημειοπροστατευτική δράση των ΜΣΑΦ έναντι του ΟΚΚ και της οικογενούς πολυποδίασης στους ανθρώπους [348, 530]. Παρ' όλα αυτά ο λόγος της ενίσχυσης της έκφρασης της COX-2 στον ΟΚΚ δεν είναι ακόμα γνωστός. Οπότε παραμένει αναπάντητο το ερώτημα κατά πόσον το COX διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση του ΟΚΚ ή αν είναι επιφανόμενο του καρκίνου [531].

Την τελευταία δεκαετία πολλές μελέτες έχουν συνδέσει την έκφραση της COX-2 με την παθογένεια πολλών τύπων καρκίνου στον άνθρωπο, περιλαμβάνοντας τον καρκίνο του μαστού [532, 533], τον καρκίνο του στομάχου [534], τον καρκίνο των πνευμόνων [535] και τον ορθοκολικό καρκίνο [340, 536]. Παρόλο που έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση COX-2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου και ορθού, εντούτοις οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση της COX-2 στον ΟΚΚ δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Η έκφραση της κυκλοξυγενάση-2 μπορεί να διεγερθεί από πολλά ερεθίσματα όπως είναι οι ογκογόνοι ιοί, αυξητικοί παράγοντες, διάφοροι εκκινητές όγκων και κυτταροκίνες. Πρόσφατες επίσης μελέτες έχουν καταδείξει ότι τα κύτταρα του στρώματος του όγκου συνεισφέρουν στην ενίσχυση της έκφρασης της COX-2 στον ΟΚΚ. Αυξημένα επίπεδα COX-2 έχουν εντοπιστεί στα μακροφάγα [340, 536], ινοβλάστες [537, 538] και ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων (VECs) [539], καταδεικνύοντας ότι ο ξενιστής και τα κύτταρα του όγκου μπορεί να συνεισφέρουν στην παραγωγή προσταγλανδινών εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και ακολούθως στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Στην εργασία αυτή μελετήσαμε βιοψίες από ιστούς ασθενών οι οποίοι διαγνώστηκαν με καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού και χειρουργήθηκαν για την νόσο τους. Μελετήσαμε τις διαφορές στην έκφραση της COX-2 στα επιθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα του στρώματος στους καρκινικούς ιστούς και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς του παχέος εντέρου και ορθού.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω το επίπεδο που η COX-2 επηρεάζει την ογκογένεση στον ΟΚΚ μελετήθηκε η σύνθεση της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) (τελικό προϊόν της κατάλυσης του αραχιδονικού οξέος από την COX-2), στους καρκινικούς ιστούς αλλά και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς του παχέος εντέρου και του ορθού και συσχετίστηκε με την ενεργότητα της τελομεράσης (hTERT) και την διαφορετική τοπογραφία ανάπτυξης του όγκου. Τέλος μελετήθηκε η σχέση της COX-2 και της PGE2 με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους του όγκου και των ασθενών.

7.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

7.2.1 Ασθενείς

Το διάστημα μεταξύ Ιουλίου 2002 και Αυγούστου 2004, έγινε δειγματοληψία ασθενών με επιβεβαιωμένο ΟΚΚ. Η μελέτη εγκρίθηκε από την τοπική επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας καθώς είχε διασφαλιστεί γραπτή συγκατάθεση όλων των συμμετεχόντων ασθενών.

Μετά την εξαίρεση του χειρουργικού παρασκευάσματος κατά τη διάρκεια χειρουργείου έγινε συλλογή 4 μικρών ιστοτεμαχίων από τον καρκίνο και 4 μικρών ιστοτεμαχίων από τον φαινομενικά υγιή παρακείμενο βλεννογόνο του παχέος εντέρου, περίπου 10 εκ. κεντρικότερα του όγκου. Εντός 10 λεπτών τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και ακολούθως φυλάχθηκαν σε ψυγείο στους -80°C μέχρι να μελετηθούν περαιτέρω. Το εναπομείναν δείγμα στάλθηκε για τακτική παθολογοανατομική εκτίμηση. Μελετήθηκαν περαιτέρω τροφικοί δείκτες όπως IGF-I και γαστρίνη, από τον ορό όλων των ασθενών.

7.2.2 Σύνθεση PGE₂ (Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal)

Η μελέτη της σύνθεσης της PGE2 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal της (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. 100 mg ιστού ομογενοποιήθηκαν με sonicator χρησιμοποιώντας 1ml διαλύματος αποτελούμενο από [Phosphate Buffer Saline

(PBS), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) και (Indo)]. Το υλικό χωρίστηκε σε δύο μέρη. Για το πρώτο μέρος χρησιμοποιήθηκαν 100μl από το πιο πάνω ομογενοποίημα. Μετά από 30 λεπτά εμβύθισης σε πάγο, το υλικό φυγοκεντρήθηκε στα 12000g για 5 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο (supernatant) ταχέως καταψύχθηκε και φυλάχθηκε στους -80°C. Χρησιμοποιήσαμε μέρος αυτού του υλικού για να υπολογίσουμε την ολική πρωτεΐνη με το πρωτόκολλο Bradford (Bio-Rad Laboratories) χρησιμοποιώντας την βόεια αλβουμίνη (BSA) ορού σαν σταθερά αναφοράς.

Για το δεύτερο μέρος χρησιμοποιήθηκαν 250μl ομογενοποιημάτος για το πρωτόκολλο καθαρισμού και απομόνωσης της προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1ml αιθανόλη και διατηρήθηκε σε πάγο για 5 λεπτά. Το υλικό φυγοκεντρήθηκε στα 3000g για 10 λεπτά στους 4°C και έγινε συλλογή του υπερκείμενου (supernatant) σε καινούργιο erpendorf. Ακολούθησε φυγοκέντρωση ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη. Στο δείγμα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (acetate buffer), pH=4 ώστε να οξινοποιήσει το δείγμα σε pH ~ 3.5-4. Προετοιμασία στηλών (SPE (C18) columns): Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 5 ml μεθανόλης και 5 ml απιονισμένου νερού και ακολούθησε εκχύλιση του δείγματος διαμέσου των στηλών με την βαρύτητα. Εν συνεχεία στο εκχυλισμένο δείγμα προστέθηκαν 5 ml διαλύματος αποτελούμενο από οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate) και 1% μεθανόλη. Έγινε συλλογή του τελικού εκχυλίσματος, στο οποίο θα προσδιοριστεί η ποσότητα της προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο κενού ώστε να αποκτήσουμε ένα κονίαμα αφού εξατμιστεί η μεθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Προστέθηκαν 500μl από το EIA buffer. Τα δείγματα αραιώθηκαν με προσθήκη EIA buffer ώστε να επιτύχουμε τελική αραιώση των δειγμάτων 1:10 και 1:100 (η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης είχε προηγουμένως υπολογισθεί με την μέθοδο Bradford). 50 μL δείγματος μετρήθηκαν σε Elisa Reader στα 405- 410 nm.

Για υπολογισμό της PGE2, χρησιμοποιήσαμε θετικό control, ώστε να δημιουργήσουμε την καμπύλη αναφοράς (Standard Curve), αποτελούμενη από 8 σειριακές διαλύσεις από 1000pg/ml έως 10pg/ml προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Η ανάλυση κάθε δείγματος έγινε με τρεις δοκιμές (δύο δοκιμές με εκχύλισμά ιστού με διαφορετικές αραιώσεις 1:10, 1:100 και μια

δοκιμή με “cold spike” δείγματος. Το τελευταίο χρησιμοποιείται, ώστε να υπολογιστεί η ποσοστιαία καθαρότητα του δείγματος κατά την διάρκεια του πειράματος απομόνωσης προσταγλανδίνης E2 (PGE2).

7.2.3 Παθολογία

Για κάθε ασθενή επιλέξαμε ένα block παραφίνης με καρκινικό ιστό για την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων COX-2. Από κάθε περίπτωση ελήφθησαν τομές πάχους 4μm από κύβους παραφίνης στις οποίες έγιναν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τον δείκτη COX-2. Εν συνεχεία, πραγματοποιήσαμε χρώση με άνοσο υπεροξειδάση σε τρία στάδια χρησιμοποιώντας το Dako kit. Αρχικά, τα δείγματα αποπαραφινώθηκαν με ξυλόζη και επανυδατώθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλκοόλης. Η ενδογενής υπεροξειδάση αναστάλθηκε χρησιμοποιώντας υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) 0.3% σε Tris buffer (pH 7.60) για 15 λεπτά. Πριν από την επίδραση του πρωτογενούς αντισώματος, οι τομές εμβυθίστηκαν σε 10nM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος (Citrate buffer), ξεπλύθηκαν σε Tris-buffered saline (TBS) και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (650-800W) για 30 λεπτά. Για να αποφύγουμε τους μη ειδικούς δεσμούς, οι τομές ξεπλύθηκαν με TBS πριν την επίδραση του πρωτογενούς αντισώματος: mouse Monoclonal anti COX-2 (αραίωση 1:100, Novocastra). Οι όγκοι με γνωστά επίπεδα έκφρασης COX-2, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Προ ευαισθητοποιημένος ορός κονίκλου χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας για να ελεγχθούν οι μη ειδικές χρώσεις. Δύο ανεξάρτητοι και «τυφλοί» ως προς τις κλινικές πληροφορίες παθολογοανατόμοι, εκτίμησαν την άνοσο-αντίδραση, προσδιορίζοντας την εκατοστιαία αναλογία των θετικά κεχρωσμένων καρκινικών κυττάρων. Οι διαφορές επιλύθηκαν με κοινή συναίνεση.

Όλες οι περιπτώσεις ταξινομήθηκαν ανάλογα με την έκφραση της COX-2 σε τρεις κατηγορίες που αντιστοιχούσαν στο ποσοστό των θετικώς χρωσθέντων νεοπλασματικών κυττάρων. Κατηγορία I $\leq 25\%$, κατηγορία II $> 25\%$ και $\leq 50\%$, κατηγορία III $> 50\%$. Η ένταση της χρώσης αξιολογήθηκε ως ασθενής, μέτρια και έντονη.

Η επιλογή των κατωτάτων ορίων για κάθε ξεχωριστό δείκτη βασίστηκε σε αντίστοιχη κατηγοριοποίηση από άλλες μελέτες. Η επιλογή των ουδών είχε προηγουμένως βρεθεί να χαρακτηρίζει καλύτερες προγνωστικές κλινικοπαθολογικές και μοριακές συσχετίσεις των υπό εξέταση δεικτών.

7.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πακέτο IBM SPSS statistics Software version 19. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm σταθερή απόκλιση (mean \pm standard errors).

Αναλόγως της εφαρμοσιμότητας χρησιμοποιήθηκαν: t-test (paired & unpaired) και one way anova με Bonferroni post hoc ανάλυση των διαφορών μεταξύ των ομάδων. Πραγματοποιήσαμε χ^2 - test για την ανάλυση των μη παραμετρικών δεδομένων σε πίνακες 2X2. Χρησιμοποιήσαμε τα test συσχετίσεων κατά Pearson και Spearman όταν αυτές ήταν εφαρμόσιμες για την περαιτέρω ανάλυση τους.

7.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.4.1 Ασθενείς

Συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας 49 ασθενείς (21 γυναίκες) με διάμεση ηλικία 74 (όρια 49-87) χρόνια με ιστολογικά επιβεβαιωμένη βιοψία για αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου ή ορθού. Τα δημογραφικά, κλινικά, και παθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον (Πίνακα 8).

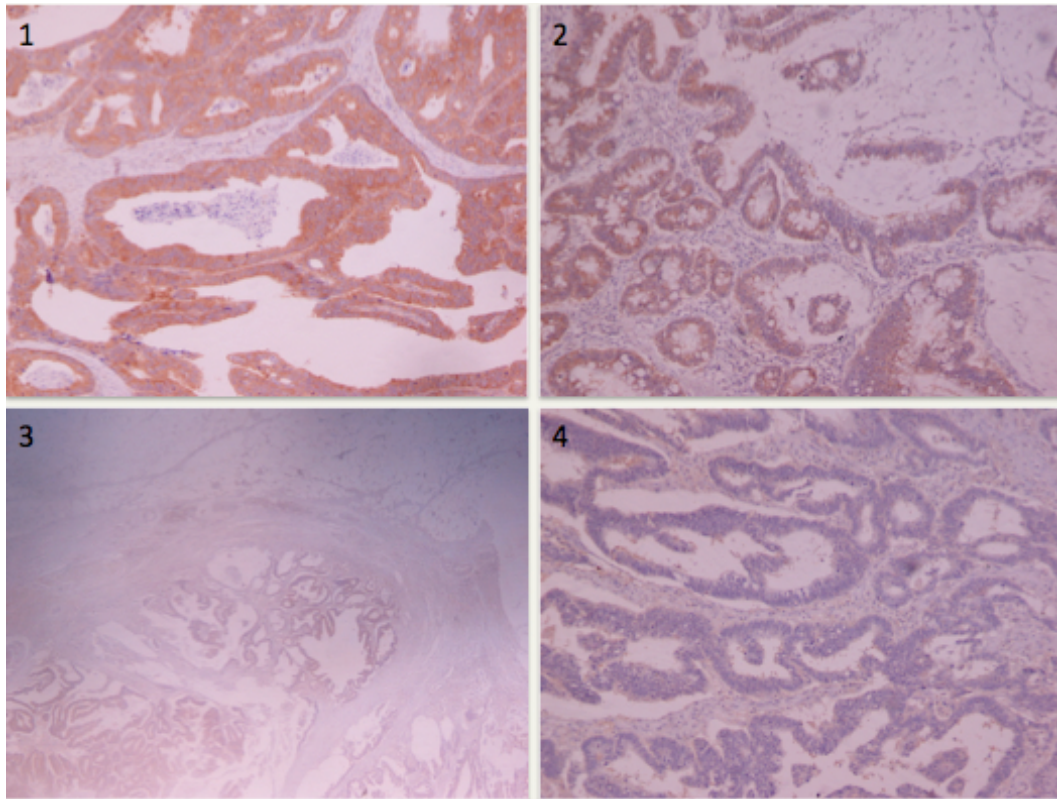
7.4.2 Ανοσοϊστοχημική έκφραση της COX-2 στους καρκινικούς ιστούς και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με ΟΚΚ

Η έκφραση της COX-2 ήταν θετική σε 40 από τις 49 περιπτώσεις καρκινικού ιστού που εξετάστηκαν (81.6%). Η χρωστική αντίδραση ήταν κυτταροπλασματική, ετερογενής και η ένταση της ήταν από ήπια έως έντονη (Σχήμα 31). Χρώση επίσης ανιχνεύθηκε και στα

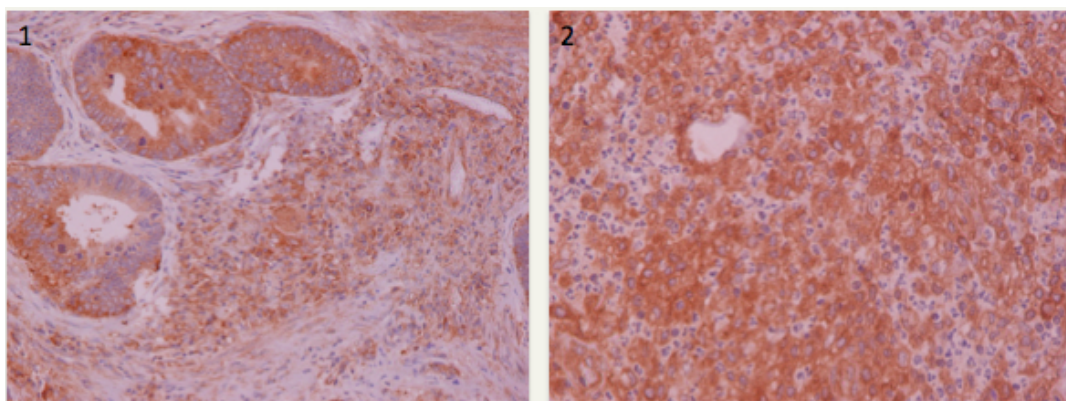
στρωματικά κύτταρα του όγκου σε πολύ λιγότερο ποσοστό (10-25%) συγκριτικά με την χρώση που ανιχνεύθηκε στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα (Σχήμα 33). Σημαντικό επίσης είναι ότι η έκφραση της COX-2 στο στρώμα των καρκινικών κυττάρων του όγκου αυξανόταν αναλογικά με το ποσοστό έκφρασης της COX-2 στα επιθηλιακά κύτταρα του όγκου. Αποτέλεσμα ήταν στους καρκινικούς ιστούς στους οποίους η επιθηλιακή έκφραση COX-2 ήταν >50%, να παρατηρηθεί και μεγαλύτερη έκφραση COX-2 στο στρώμα του όγκου με ενισχυμένη την χρώση των ιστοκυττάρων, ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων. (Σχήμα 32). Παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη έκφραση COX-2 στο στρώμα των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών σε ποσοστό αντίστοιχο με το ποσοστό έκφρασης της COX-2 στο στρώμα των καρκινικών ιστών (10-25%) (Σχήμα 33). Επίσης μόλις στο (3%) παρατηρήθηκε έκφραση COX-2 στο επιθήλιο και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών (Σχήμα 33).

Πίνακας 8. Δημογραφικά, κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών

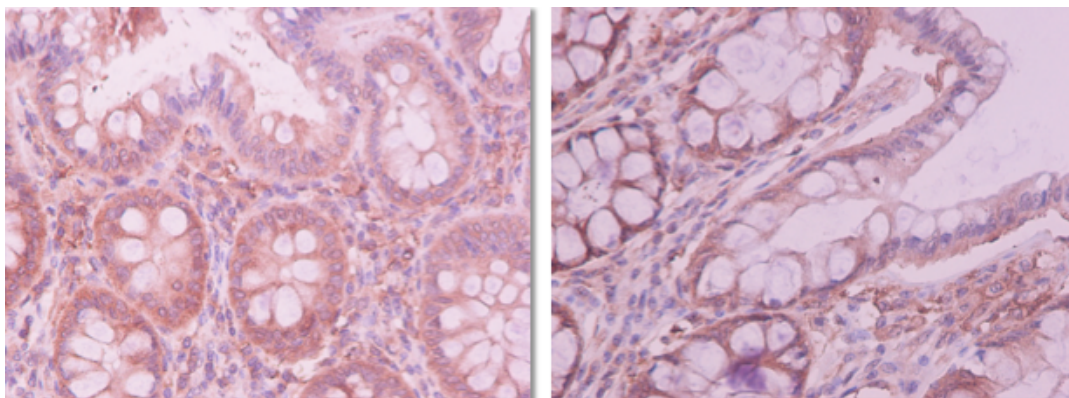
Characteristic	No.
Patients	
Cancer tissues	49
Adjacent normal tissues	49
Sex	
Male	28
Female	21
Smoking	
Yes	12
No	34
BMI	
< 25	21
≥ 25	25
Dukes staging system	
B	25
C	19
D	5
Histology grade	
High	4
Medium	41
Low	4
Tumour location	
Right colon	8
Left colon	24
Rectum	17
BMI = body mass index.	



Σχήμα 31. Παρασκευάσματα από ΟΚΚ με τυπική εικόνα από το επιθήλιο. Στην άνοσο χρώση με έντονα θετική ανοσοαντίδραση (ποσοστό χρώσης >50%) για COX-2 ($\times 100$) (άνω αριστερά,1), μέτρια θετική ανοσοαντίδραση (ποσοστό χρώσης >25% & $\leq 50\%$) για COX-2 ($\times 100$) (άνω δεξιά,2), ήπια θετική ανοσοαντίδραση (ποσοστό χρώσης $\leq 25\%$) για COX-2 ($\times 20$) (κάτω αριστερά,3), συγκριτικά με αρνητική ανοσοαντίδραση (ποσοστό χρώσης 0%) (κάτω δεξιά,4).



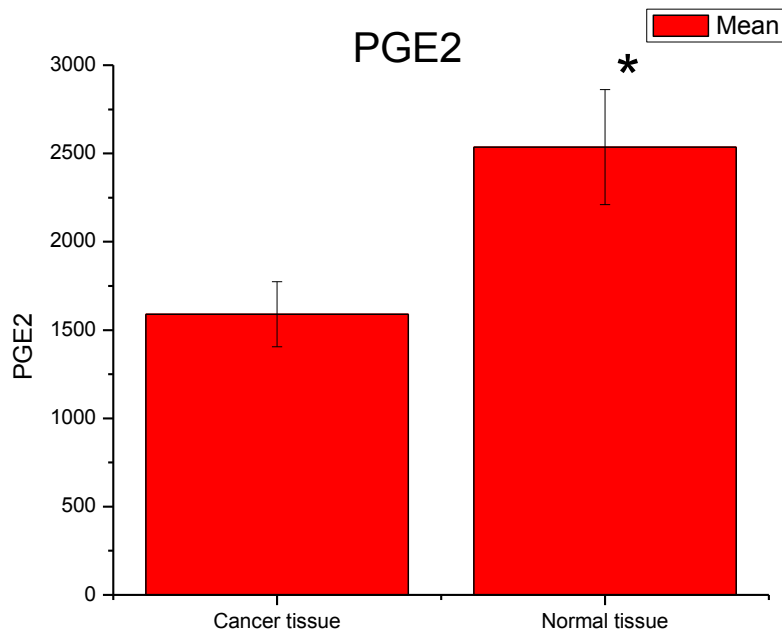
Σχήμα 32. Παρασκευάσματα από ΟΚΚ με εικόνα από το στρώμα (ιστιοκυττάρων, ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων). COX-2 ($\times 200$) θετική χρώση στρώματος (αριστερά,1) και COX-2 ($\times 400$) θετική χρώση στρώματος (δεξιά,2).



Σχήμα 33. Παρασκευάσματα από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό ασθενών με ΟΚΚ με εικόνα από το στρώμα (ιστιοκυττάρων, ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων). COX-2 ($\times 400$) θετική χρώση στρώματος (δεξιά) & (αριστερά).

7.4.3 Επίπεδο σύνθεσης της PGE₂ στον ΟΚΚ συγκρινόμενη με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό

Σε 34 από το σύνολο των 49 καρκινικών ιστών με τους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς μελετήθηκε η σύνθεση PGE₂. Αναγνωρίσαμε την σύνθεση της PGE₂ σε όλους τους καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου και ορθού αλλά και σε όλους τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Η μέση τιμή της PGE₂ ήταν στατιστικά υψηλότερη στα δείγματα παρακείμενου φυσιολογικού ιστού συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα καρκίνου παχέος εντέρου και ορθού. ($p=0.013$) (Σχήμα 34).



Σχήμα 34. Επίπεδο σύνθεσης PGE₂ σε δείγματα καρκινικών ιστών με τον αντίστοιχο παρακείμενο φυσιολογικό ιστό σε 35 ασθενείς με ΟΚΚ (* p=0,013).

7.4.4 Σύνθεση PGE₂ και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

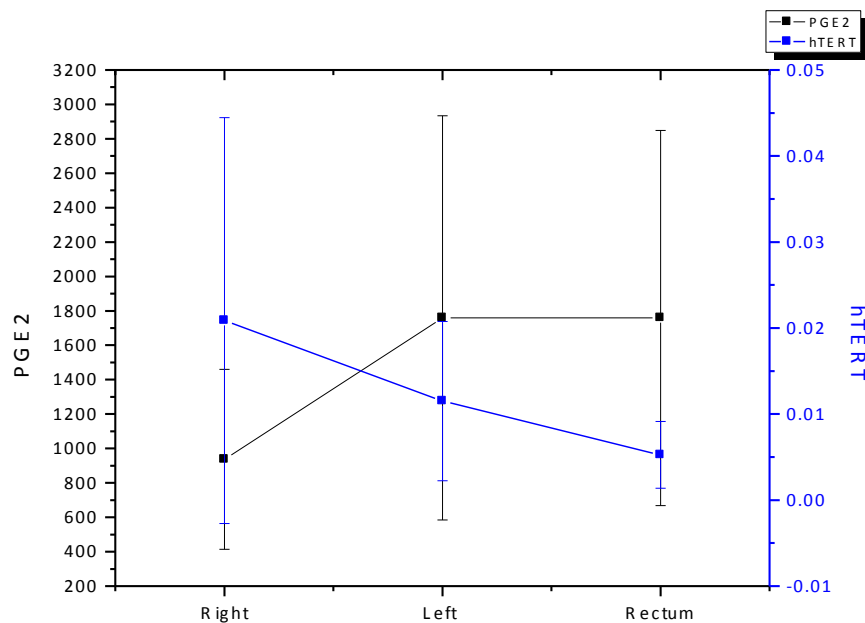
Όταν αναλύθηκε η σχέση μεταξύ των κλινικοπαθολογικών παραγόντων και του επιπέδου σύνθεσης της προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂), δε βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά σε σχέση με το φύλο, την ηλικία, το κάπνισμα, τον δείκτη μάζας σώματος, την τοπογραφία του όγκου, το ιστολογικό στάδιο και το στάδιο κατά Dukes (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Συσχέτιση μεταξύ της σύνθεσης PGE2 και κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών.

Variable	Normal mucosa				Cancer tissue			
	No	Mean	SD	p-value	No	Mean	SD	p-value
All cases	34	2374.04	1695.081		34	1589.622	1075.305	0.013
Sex								
Male	13	1976.704	1477.7668		13	2034.405	1305.7355	
Female	22	2866.836	2109.3560	0.056	21	1314.280	822.6191	0.191
Smoke								
No	24	2374.842	1669.7945		24	1419.926	860.0917	
Yes	8	2796.588	2498.2338	0.59	7	1667.929	1206.1716	0.545
BMI								
<25	19	2244.542	1745.6862		19	1812.677	1191.0385	
≥25	16	2882.578	2124.8944	0.336	15	1307.085	865.2102	0.177
Duke's stage								
A	0				0			
B	16	3273.561	2036.8244		15	1696.322	904.9637	
C	15	1930.935	1782.8859		15	1423.153	1294.7909	
D	4	1856.634	1055.7880		4	1813.756	900.6809	
A+B	16	3273.561	2036.8244		15	1696.322	904.9637	
C+D	19	1915.293	1630.6619	0.036	19	1505.385	1210.7447	0.615
Grade								
Low	4	2617.679	1318.3896		4	1261.628	802.6919	
Moderate	28	2682.486	2039.2589		27	1700.093	1127.0442	
High	3	1062.409	859.9787	0.393	3	1032.711	868.3637	0.495
Tumor site								
Right	7	936.412	523.0055		7	1667.951	1410.0214	
Left	7	2077.241	1396.8070		7	2929.321	2674.6937	
Sigmoid	10	1536.713	1007.5961		10	2580.901	1377.0804	
Rectum	10	1758.445	1090.7798	0.608	11	2797.966	2169.4357	0.236
Right colon	7	1667.951	1410.0214		7	936.412	523.0055	
Left colon	28	2753.282	1996.2152	0.186	27	1758.973	1122.4103	0.071
Colon	24	2416.246	1841.0003		24	1519.279	1084.3813	
Rectum	11	2797.966	2169.4357	0.594	10	1758.445	1090.7798	0.563
Ki-67 expression								
Negative	3	3617.660	2180.4306		3	1245.514	643.9262	
Positive	32	2434.830	1907.2952	0.449	31	1622.923	1109.6303	0.441
p53 expression								
Negative	12	3271.839	1679.5463		12	1526.599	861.8398	
Positive	23	2152.412	1967.9908	0.09	22	1623.998	1193.4976	0.786

7.4.5 Μελέτη της σύνθεσης της PGE₂ στους όγκους δεξιού κόλου και αριστερού κόλου, και σύγκριση με την hTERT

Όταν οι όγκοι χωρίστηκαν σε δεξιό και αριστερό κόλον, η σύνθεση της προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂) φαίνεται να αυξάνεται από δεξιά προς τα αριστερά και προς το ορθό, παρουσιάζοντας αυξημένη έκφραση στους καρκίνους του ορθού και αριστερού κόλου συγκριτικά με τους καρκίνους του δεξιού κόλου αλλά αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 9). Επίσης φαίνεται η σύνθεση της PGE₂ να είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ενεργότητα της τελομεράσης η οποία παρουσίαζε άυξημένη έκφραση (hTERT) στους καρκίνους δεξιού κόλου και λιγότερη έκφραση στους καρκίνους αριστερού κόλου και ακόμα λιγότερη στους καρκίνους του ορθού (Σχήμα 35), ($p=0,006$)



Σχήμα 35. Σύνθεση PGE₂ από το δεξιό κόλον προς το αριστερό κόλον και προς το ορθό (μαυρη γραμμή). Εκφραση hTERT από το δεξιό κόλον προς το αριστερό κόλον και προς το ορθό (μπλε γραμμή). ($p=0,006$)

7.4.6 Συσχέτιση της σύνθεσης PGE₂ με το στάδιο νόσου (κατά Dukes) στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό ασθενών με ΟΚΚ

Παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη σύνθεση PGE₂ στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό ασθενών με στάδιο νόσου A ή B κατά Dukes, συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό ασθενών με στάδιο νόσου C ή D κατά Dukes στους οποίους παρατηρήθηκε μειωμένη σύνθεση PGE₂ ($p=0,036$). Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι στα αρχικά στάδια το φυσιολογικό μικροπεριβάλλον (στρώμα) των ασθενών μπορεί να είναι πιο επιδεκτικό στην δημιουργία όγκων μέσω του μονοπατιού της COX-2, ενώ σε προχωρημένο στάδιο νόσου η επέκταση του καρκίνου μπορεί να μειώνει αυτή την ικανότητα. Επίσης μπορεί να υπάρχει λιγότερη αναγεννητική ικανότητα του επιθηλίου του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού ασθενών με προχωρημένο καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού. Τέλος σε προχωρημένη νόσο παρόλη την αυξημένη έκφραση COX-2, υπάρχει ένδεια αραχιδονικού οξέος (λόγω κατάλυσης του από την COX-2), οπότε δεν παράγεται αντίστοιχα μεγάλη ποσότητα PGE₂.

7.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ενδιαφέρον τελευταία έχει επικεντρωθεί στην ικανότητα της COX-2 να καταστέλλει την απόπτωση, καθώς αυτή η καταστολή θεωρείται πως ευνοεί την καρκινογένεση επιτρέποντας την επιβίωση των κυττάρων που τυγχάνουν μετάλλαξης [539]. Πολλές είναι οι υποθέσεις για να επεξηγήσουν το αίτιο της καταστολής της απόπτωσης σαν απάντηση στην υπερέκφραση της COX-2. Αυτές περιλαμβάνουν την επαγόμενη από την προσταγλανδίνη υπερέκφραση του Bcl-2 [540], την μείωση του αραχιδονικού οξέος (διεγέρτης της απόπτωσης), μέσω της COX-2 επαγόμενης μετατροπής του σε προσταγλανδίνη [541].

Αντιστρόφως, πολλά ΜΣΑΦ αυξάνουν τον αποπτωτικό θάνατο [542], παρόλο που αυτό είναι λίγο απίθανο να συμβαίνει μόνο μέσω της καταστολής της ενεργότητας της COX, καθώς η επαγόμενη από τα ΜΣΑΦ απόπτωση έχει παρατηρηθεί σε κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζεται η κυκλοξυγενάση [543]. Περαιτέρω βέβαια, κάποιες μελέτες έδειξαν ότι πολλοί παράγοντες που διεγείρουν την έκφραση της COX-2 επάγουν την απόπτωση [544-

547]. Με άλλα λόγια ο ρόλος της COX-2 στον μηχανισμό της απόπτωσης δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί .

Η COX-2 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση σε διάφορα συστήματα όπως είναι ο ΟΚΚ, καρκίνος μαστού, καρκίνος πνευμόνων, καρκίνος οισοφάγου, και παγκρεατικός καρκίνος [535, 536, 548-550]. Η πιο ενδελεχής έρευνα για την COX-2 όμως αφορά τον ΟΚΚ. Η αναστολείς της COX-2 όπως είναι (ασπιρίνη, ΜΣΑΦ, celecoxib) φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί στην πρόληψη του ΟΚΚ [551-553], ώστε να προτείνεται πιθανός παθογενετικός ρόλος της COX-2 στην ογκογένεση του παχέος εντέρου και του ορθού [554]. Έτσι κατ' επέκταση και οι προσταγλανδίνες (PGs) και ειδικότερα η PGE2 (τελικό προϊόν της κατάλυσης του αραχιδονικού οξέος από την COX-2), φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου καθώς επηρεάζει την μιτογένεση, τη κυτταρική πρόσφυση και διείσδυση, την απόπτωση και τον άνοσο-έλεγχο [555].

Η PGE2 εν αντιθέσει με την COX-2 δεν μελετήθηκε ευρέως στην βιβλιογραφία πιθανότατα λόγω του ότι είναι ένα ασταθές προϊόν με χρόνο ημίσειας ζωής 30 δευτερόλεπτα με αποτέλεσμα να είναι πολύ δύσκολο να απομονωθεί.

Η θετική ανοσοαντίδραση της COX-2 εντοπίζεται μέσω κυτταροπλασματικής χρώσης στα επιθηλιακά κύτταρα του καρκίνου. Σε πρόσφατη μελέτη από τους Mahmoud AS, *et al.* 2014, έχει επίσης εντοπιστεί θετική ανοσοαντίδραση έναντι της COX-2 και στα κύτταρα του στρώματος όπως είναι τα μονοπύρρηνα κύτταρα, ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών [556].

Στη μελέτη μας βρήκαμε ότι COX-2 εκφράζουν έντονα τα επιθηλιακά κύτταρα του καρκίνου και σε λιγότερο βαθμό βεβαίως το στρώμα του καρκίνου του παχέος εντέρου και ορθού, επιδεικνύοντας ότι και τα δύο μπορούν να συνεισφέρουν στην παραγωγή προσταγλανδινών εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Αυτή η γνώση ήταν ήδη γνωστή από αρκετές προγενέστερες μελέτες για τον ΟΚΚ, οι οποίες αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη COX-2 επιλεκτικά εκφραζόταν στα καρκινικά κύτταρα αντί στο στρώμα του καρκίνου [557, 558].

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, έρχονται και μεταγενέστερες μελέτες που θέλουν το στρώμα και το επιθήλιο καρκινικών κυττάρων να εκφράζουν COX-2 στα αδενώματα [559-561] και στα καρκινώματα [562-564]. Οι Charalambous, *et al.* σε μια μελέτη το 2003, [565] βρήκαν ότι υπήρχε σημαντική αύξηση της έκφρασης της COX-2 στα επιθηλιακά κύτταρα του ΟΚΚ συγκριτικά με τον παρακείμενο φυσιολογικό επιθήλιο. Αυτή η διαφορά όμως δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα του στρώματος (μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα). Σε μεταγενέστερη μελέτη το 2009 ο ίδιος συγγραφέας, βρήκε ότι η έκφραση της COX-2 ήταν υψηλότερη στα κύτταρα στρώματος του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού συγκριτικά με το στρώμα του καρκίνου [566]. Παρόμοια αποτελέσματα έκφρασης της COX-2 βρήκαμε και στην δική μας μελέτη, στην οποία προχωρήσαμε επιπλέον και στην μελέτη της σύνθεσης της προσταγλανδίνη E2 (PGE2). Επιβεβαιώσαμε ότι υπάρχει αυξημένη σύνθεση PGE2 στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό συγκριτικά με τον καρκινικό ιστό σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0,013$).

Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι στον καρκινικό ιστό η έκφραση της COX-2 είναι καθ' υπερροχή επιθηλιακή ενώ στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό είναι καθ' υπερροχή στρωματική. Η τελευταία παρατήρηση συμφωνεί με προγενέστερες μελέτες οι οποίες εισηγούνται ότι η έκφραση της COX-2 στα κύτταρα του στρώματος εμπλέκεται άμεσα με την αγγειογένεση, προετοιμάζοντας τον παρακείμενο ιστό του παχέος εντέρου και του ορθού για τοπική επέκταση του κακοήθους όγκου [538, 567, 568]. Αυτό υποστηρίζεται και από επιπλέον μελέτες που αποδεικνύουν ότι η COX-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης σε αρκετούς τύπους καρκίνων περιλαμβάνοντας και τον ΟΚΚ [569, 570].

Στην δική μας σειρά βρήκαμε έκφραση της COX-2 στο 81% των ΟΚΚ όπως αυτό μετρήθηκε με ανοσοϊστοχημεία. Όπως και σε άλλες μελέτες έτσι και στην δική μας η έκταση της έκφρασης της COX-2 στον καρκίνο αλλά και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό του παχέος εντέρου και του ορθού τον καθιστά εκ των πραγμάτων εμπλεκόμενο αίτιο στη καρκινογένεση [571].

Στη μελέτη μας δεν υπήρξε κάποια σημαντική συσχέτιση τόσο στην έκφραση της COX-2 όσο και στην σύνθεση της PGE₂, με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα, ΔΜΣ) αλλά ούτε και με χαρακτηριστικά του όγκου (ιστολογικός τύπος, στάδιο νόσου). Σε συμφωνία με τις δικές μας παρατηρήσεις αναφέρεται και μια πρόσφατη ανοσοϊστοχημική μελέτη των Mahmoud, *et al.* 2014, για την έκφραση της COX-2 στην οποία δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στην άνοσο χρώση (έκφραση COX-2) και στη τοπογραφία του όγκου, την μακροσκοπική εικόνα (μέγεθος) του όγκου [556]. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε παλαιότερη μελέτη των Tomozawa, *et al.* 2000, [536] με 63 ασθενείς με προχωρημένο ΟΚΚ, στην οποία υπήρξε έκφραση COX-2 σε όλους τους ασθενείς. Σε αυτή την μελέτη, βρέθηκε ότι δεν υπήρξε καμία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της COX-2 και στην τοπογραφία του όγκου, την ηλικία, το φύλο, το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό τύπο, το βάθος διήθησης του τοιχώματος, την λεμφαδενική διασπορά και τις μεταστάσεις. Επιπλέον στη μελέτη των Pisano, *et al.* 2005, [559] για την έκφραση της COX-2 στα αδενώματα όμως του παχέος εντέρου και του ορθού αυτή τη φορά, στην οποία βρέθηκε θετική κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη της COX-2, σε 62 από τα 68 αδενώματα, επίσης δεν ανιχνεύτηκε κάποια συσχέτιση της έκφρασης της COX-2 με την ηλικία, το φύλο, τον ιστολογικό τύπο των αδενωμάτων (σωληνώδη ή σωληνολαχνωτά), την τοπογραφία τους στο παχύ έντερο (εγγύς ή περιφερικό τμήμα) και την μορφολογία των αδενωμάτων (μισχωτά ή άμισχα). Η χρώση τόσο στο επιθήλιο όσο και στο στρώμα των κυττάρων ήταν υψηλότερη στα μεγαλύτερα αδενώματα (>4mm) συγκριτικά με τα μικρότερα (<4mm) (p=0.037 and p=0.024) [559].

Σε αρκετές μελέτες φαίνεται ότι διάφοροι παράγοντες όπως είναι τα ΜΣΑΦ [544], ο TGF [546], το butyrate [545] και το ceramide [547] σε δόσεις που προκαλούν απόπτωση, προκαλούν αύξηση της έκφρασης της COX-2, υποστηρίζοντας ότι η επαγόμενη έκφραση της COX-2 είναι πολύ πιθανόν να ανταποκρίνεται σε αποπτωτικά ερεθίσματα. Είναι επομένως πιθανόν σε υπερέκφραση της COX-2, τα καρκινικά κύτταρα να αντιστέκονται στην απόπτωση. Σε πολλές επίσης μελέτες που ασχολήθηκαν με τους καρκίνους του γαστρεντερικού σωλήνα (ΓΕΣ), η έκφραση της COX-2 μειώνεται σε καρκίνους ΓΕΣ με

ελλαττωματικό σύστημα MMR [572-574]. Οι Diamantopoulou, *et al.* 2005, [575] μελέτησε την έκφραση της COX-2 σε σχέση με το αποπτωτικό δυναμικό και βρέθηκε επίσης ότι η έκφραση της COX-2 σχετίστηκε θετικά με την ποσοτική έκφραση του MLH1 (γονίδιο του συστήματος MMR). Ως εκ τούτου η έκφραση της COX-2 αναμένεται να είναι μειωμένη στο δεξιό κόλον στο οποίο έχουμε μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) συνεπεία έλλειψης του γονιδίου MLH1. Αυτό έρχεται σε συμφωνία εμμέσως με την δική μας μελέτη στην οποία βρήκαμε λιγότερη παραγωγή PGE2 στο δεξιό κόλον συγκριτικά με το αριστερό και το ορθό. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε επίσης ότι η ανοσοθετικότητα της COX-2 είναι αντιστρόφως ανάλογη της πυρηνικής θέσης του καταλυτικού συστατικού του συμπλέγματος της τελομεράσης, (hTERT). Αυτό έρχεται επίσης σε συμφωνία με την δική μας εργασία στην οποία βρήκαμε αντίστροφα ανάλογη σχέση μεταξύ σύνθεσης PGE2 και της hTERT ενισχύοντας περαιτέρω την θετική του σχέση με την απόπτωση, όσον αφορά τουλάχιστον την τοπογραφία του όγκου όταν αυτή χωρίστηκε σε όγκους δεξιού κόλου και όγκους αριστερού κόλου. Έτσι στην εργασία μας βρήκαμε ότι, στο δεξιό κόλον παρουσιάζεται λιγότερη παραγωγή PGE2 και αυξημένη έκφραση hTERT, ενδεικτικό καταστολής της απόπτωσης. Από την άλλη, στο αριστερό κόλον και στο ορθό παρουσιάζεται αυξημένη παραγωγή PGE2 και μειωμένη έκφραση hTERT, ενδεικτικό ενίσχυσης της απόπτωσης.

Επιβεβαίωση στη πιο άνω παρατήρηση προέρχεται και από μια προγενέστερη μελέτη των Dimberg J, *et al.* 1999, [576] οι οποίοι μελέτησαν την διαφορετικότητα στην έκφραση της COX-2 ανάμεσα στις διάφορες θέσεις του ΟΚΚ και απέδειξε με Western blot ανάλυση στατιστικά σημαντική αυξημένη επίπτωση ($p < 0,001$) υπερέκφρασης της COX-2 στους καρκίνους του ορθού συγκριτικά με το παχύ έντερο. Η εξήγηση που δόθηκε τότε ήταν ότι αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές γενετικές μεταβολές στα κύτταρα του όγκου και σε διαφορετική έκφραση των ρυθμιστικών γονιδίων της COX-2 στο παχύ έντερο και στο ορθό. Περαιτέρω όμως μπορεί τα αποτελέσματα αυτά να αντανακλούν δευτερογενείς αλλαγές στην εξέλιξη του όγκου η οποία ρυθμίζει διαφορετικά την επαγωγή της COX-2 στο παχύ έντερο και στο ορθό [576].

Σε συμφωνία με τα πιο πάνω, επίσης σε μια μεταανάλυση από τους Peng L, *et al.* το 2013, [554] αποδείχθηκε επίσης ότι υπήρξε μεγαλύτερη έκφραση COX-2 σε ασθενείς με καρκίνο ορθού, από ότι σε ασθενείς με καρκίνο εντοπιζόμενο στο παχύ έντερο πιθανότατα λόγω τοπικής ποικιλομορφίας των γονιδιακών ρυθμιστικών παραγόντων που ευθύνονταν για την έκφραση της COX-2 [576].

Στην ίδια μεταανάλυση συμπερασματικά βρέθηκε ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της COX-2 συσχετίστηκε με πτωχή συνολική επιβίωση στον ΟΚΚ, αλλά όχι με επιβίωση ελεύθερης νόσου [554]. Παρόμοια συσχέτιση της έκφρασης της COX-2 με πτωχή επιβίωση έχει βρεθεί και σε προγενέστερη μελέτη που αφορούσε ουροθηλιακό καρκίνο [575].

Παρόλη όμως τον ευρέως αποδεκτό ρόλο της COX-2 στην εξέλιξη του όγκου, εντούτοις υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες σχετικά με την προγνωστική σημαντικότητα της COX-2 όσον αφορά τον ΟΚΚ [554].

Στις αρχές του 1990 οι φαρμακευτικές εταιρείες ξεκίνησαν διάφορα πρωτόκολλα (PreSAP) study [553], (APC) trial [552], (APPROVe) study [577], για την παραγωγή και εξέλιξη αναστολέων επιλεκτικά για την COX-2 οι οποίοι δεν επηρεάζουν την ενεργότητα της COX-1 οπότε και αποφεύγεται η τοξικότητα του ΓΕΣ, η τοξικότητα στο νεφρό και η αντι-αιμοπεταλιακή δράση. Έτσι οι επιλεκτικοί αναστολείς της COX-2 θα ήταν ιδανικά φάρμακα για την πρόληψη του ΟΚΚ, αφού αποδείχθηκε αυξημένη έκφραση COX-2 από το πρώτο κίόλας τροποποιημένο κύτταρο και καθ' όλη την διαδικασία αδενώματος – καρκινώματος στο παχύ έντερο και στο ορθό [570, 578, 579].

Η ανακάλυψη όμως της τοξικότητας της COX-2 στο καρδιαγγειακό έκανε την συστηματική εφαρμογή αυτών των φαρμάκων στην πρόληψη του ΟΚΚ πολύ δύσκολη [580]. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα ΜΣΑΦ ασκούν την αντικαρκινικές ιδιότητες τους είναι προς το παρόν άγνωστες. Η καταστολή της COX-2 και της σύνθεσης των προσταγλανδινών είναι πολύ σημαντικό βήμα στην πρόληψη του ΟΚΚ καθώς η COX-2 συμμετέχει στην ογκογένεση μέσω πολλαπλών μηχανισμών [303]. Η καταστολή της COX-2 μπορεί να μειώσει τον πολλαπλασιασμό, να επάγει την απόπτωση, να καταστείλει την αγγειογένεση του όγκου, να προλάβει την καταστολή του ανοσοποιητικού. Παρόλα αυτά οι αναστολείς της

COX λειτουργούν επίσης και μέσω ανεξάρτητου, της COX-2, μονοπατιού. Η celecoxib μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη και να επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα που δεν εκφράζουν COX. Πρόσφατα έχουν εισηγηθεί πολλοί παράγοντες που δεν στοχεύουν στην αναστολή της COX-2, [581-584] όπως είναι αναστολή του NF-κB, ενεργοποίηση του peroxisome-proliferator-activating receptor, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης G και αναστολή της αντι αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-XL . Οι στοχευμένες πλέον θεραπείες και η χρήση τους στην χημειοπροφύλαξη αποτελούν μεγάλη προσδοκία αλλά όμως δεν έχουν ακόμα ανακαλυφθεί. Ο ανασταλτικός μηχανισμός των ΜΣΑΦ έναντι της καρκινογένεσης στον ΟΚΚ δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Εάν η καταστολή της COX-2 είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου ασκούν την δράση τους τα ΜΣΑΦ, τότε αυτοί οι παράγοντες θα πρέπει να στοχεύουν όγκους που υπερεκφράζουν COX-2 [585].

7.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά στην εργασία μας αυτή έχουμε βρει ότι η COX-2 πέραν των επιθηλιακών κυττάρων του καρκίνου, εκφράζεται και στα κύτταρα του στρώματος του καρκινικού ιστού αλλά και στο στρώμα του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Επιπλέον προς επιβεβαίωση του παραπάνω, αποδείξαμε ότι η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) (τελικό προϊόν, της κατάλυσης του αραχιδονικού οξέος από την COX-2), παράγεται σε σημαντικά περισσότερο βαθμό στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό συγκριτικά με τον καρκινικό ιστό ($p=0,0013$). Αυτό συνηγορεί στο ότι η ο ρόλος της COX-2 συμμετέχει από τα αρχικά μόλις στάδια του μηχανισμού της ογκογενετικής εξέλιξης στο παχύ έντερο και στο ορθό.

Επιβεβαιώσαμε επίσης ότι υπάρχει μια τάση αυξημένης σύνθεσης PGE2 στο αριστερό κόλον και στο ορθό συγκριτικά με το δεξιό κόλον καθώς επίσης και αντιστρόφως-ανάλογη σχέση με την ενεργότητα της τελομεράσης (hTERT), ένδειξη διαφορετικής συμπεριφοράς των όγκων αναλόγως τοπογραφίας.

Τέλος επιβεβαιώσαμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης COX-2 ούτε της PGE2 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (ηλικία, φύλο, κάπνισμα, ΔΜΣ, ιστολογικό τύπο, στάδιο νόσου).

Εάν η καταστολή της σύνθεσης PGE2 είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου ασκούν την δράση τους τα ΜΣΑΦ, τότε αυτοί οι παράγοντες θα πρέπει να στοχεύουν στην πρόληψη (αρχικά στάδια εξέλιξης όγκου), βλαβών εντερικού επιθηλίου κυρίως στο αριστερό κόλο ή ορθό όπου υπερεκφράζεται η COX-2.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 2

(In-Vitro Ερευνητικό Πρωτόκολλο)

8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΚΤΡΕΤΙΔΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ (hTERT).

8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λόγω ακριβώς της αυξημένης επίπτωσης του ορθοκολικού καρκίνου (ΟΚΚ) και της συνοδού νοσηρότητας και θνητότητας, έχει γίνει αντικείμενο πολλής έρευνας όσον αφορά τη αιτιολογία, την διάγνωση και την θεραπεία του. Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλά έχουν διδαχθεί για την μοριακή βιολογία της νόσου θέτοντας τις βάσεις για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

Η οκτρεοτίδη είναι ένα οκταπεπτιδίο που μιμείται την φυσική φαρμακολογική δράση της σωματοστατίνης, εντούτοις είναι πιο ικανός αναστολέας της αυξητικής ορμόνης, γλυκαγόνης, ινσουλίνης. Αρχικά η σωματοστατίνη περιεγράφηκε σαν φυσικός ανασταλτικός παράγοντας της αυξητικής ορμόνης, η οποία αργότερα αποδείχθηκε ότι έχει πολλές μεταβολικές και ανοσολογικές δράσεις, καθώς δεσμεύεται σε πέντε υποδοχείς σωματοστατίνης (sst5) [399, 586]. Οι υποδοχείς αυτοί είναι G-coupled protein receptors και προκαλούν την κυτταρική απόκριση μέσω δευτερευόντων μηνυμάτων (second-messenger systems). Αυτά περιλαμβάνουν άμεσους και έμμεσους μηχανισμούς, οι οποίοι μπορεί να είναι συνεπεία της μείωσης ή της αναστολής της έκκρισης αυξητικών ορμονών και αυξητικών παραγόντων που διεγείρουν την ανάπτυξη διαφόρων τύπων κακοηθειών [395, 587]. Η σωματοστατίνη και το συνθετικό της ανάλογο, η οκτρεοτίδη, είναι δυνητικά δραστικές έναντι του καρκίνου του παχέος και του ορθού ακριβώς λόγω της ικανότητας τους να επάγουν απόπτωση και της κατασταλτικής τους δράσης έναντι του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος και φαίνεται να ξεκινά την έκκριση μιτογόνων σημάτων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, δρώντας ακριβώς σαν τροφικός παράγοντας στα καρκινικά κύτταρα.

Η τελομεράση είναι ένα πυρηνικό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ενζυμικό σύμπλεγμα του οποίου η δράση έχει συνδεθεί με τις διαδικασίες που κυβερνούν την κυτταρική γήρανση και την κυτταρική αθανατοποίηση [259, 588]. Η ενεργότητα της τελομεράσης είναι συνήθως απύσασ από τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά εκφράζεται έντονα στα καρκινικά κύτταρα [589]. Ο ΟΚΚ έχει φανεί να εκφράζει υψηλά επίπεδα ενεργότητας τελομεράσης [495, 590, 591], έτσι η τελομεράση αντίστροφη τρσνσκριπτάση (hTERT) έχει προταθεί σαν δυνητικός βιοδείκτης του ΟΚΚ [495]. Προσφάτως η αναστολή της τελομεράσης σε ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα έχει φανεί να οδηγεί σε μαζικό κυτταρικό θάνατο [592]. Εντούτοις όλες οι ρυθμιστικές διαδικασίες που κυβερνούν την έκφραση της τελομεράσης είναι ακόμα υπό έρευνα.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να αξιολογηθεί η παρουσία των υποδοχέων της σωματοστατίνης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου (Caco-2 και HT-29) και ταυτόχρονα να μελετηθεί η δράση της οκτρεοτίδης (ανάλογου της σωματοστατίνης) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ή χωρίς την επίδραση του τροφικού παράγοντα (ινσουλίνης). καθώς επίσης και να διερευνηθεί η εμπλοκή της πρωτεΐνης των τυροσινικών φωσφατασών (PTPs) και της τελομεράσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

8.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8.2.1 Κυτταρικές σειρές, αντιδραστήρια και χημικές ουσίες

Οι επιθηλιακές κυτταρικές σειρές από ανθρώπινου καρκίνου παχέος εντέρου Caco-2 και HT-29 αποκτήθηκαν από το ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, UK). Η οκτρεοτίδη και η ινσουλίνη προμηθευθήκαν από την Sandoz Corp. (Wilson, NC). Τα αντιδραστήρια McCoy's 5A, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, L-glutamine, Modified Eagles Minimum Essential Medium (MEM) και MEM non-essential amino acids, sodium bicarbonate and sodium pyruvate αγοράστηκαν από την εταιρεία Gibco (Invitrogen, UK). Οι χημικές ουσίες 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sodium orthovanadate και dimethyl sulfoxide (DMSO) εφοδιάστηκαν από την εταιρεία Sigma-

Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). Το Bio-tek microplate reader (Bio-tek Instruments, Inc, USA) χρησιμοποιήθηκε για τα MTT assays. Όλα τα πλαστικά προϊόντα αγοράστηκαν από την εταιρεία NUNC (NUNC, Roskilde, Denmark).

8.2.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29 καλλιεργήθηκαν μέσα σε φλάσκες 75cm² με μέσο MEM και McCoy's 5A, αντίστοιχα. Τα δύο αυτά μέσα καλλιέργειας εμπλουτίστηκαν με 10% heat-inactivated FBS, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine, 0.1mM MEM non-essential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate and 1.0mM sodium pyruvate. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε υγρή ατμόσφαιρα στους 37°C και 5%CO₂. Η αλλαγή του μέσου καλλιέργειας γινόταν κάθε τρίτη μέρα.

8.2.3 [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay]

Τα MTT assays χρησιμοποιήθηκαν για να καθοριστεί η κυτταρική βιωσιμότητα και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, όπως περιγράφεται στο άρθρο αυτό [593]. Εν συντομία, οι κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29, καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 2x10⁴cells/well και 1.5x10⁴cells/well αντίστοιχα, σε 24-well plates και φυλάχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας για μια νύχτα (ημέρα 0). Ακολούθως τα κύτταρα Caco-2 και HT-29 αφέθηκαν σε αδράνεια με στέρωση ορού καλλιέργειας καθώς έγινε επίδραση με 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰ και 10⁻¹² mol/L οκτρεοτίδης και 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰, 10⁻¹² και 10⁻¹⁴ mol/L ινσουλίνης αντίστοιχα. Το Sodium orthovanadate (Na₃VO₄) χρησιμοποιήθηκε επίσης σε ποικίλες συγκεντρώσεις (10⁻⁶-10⁻⁸M) σε συνδυασμό με την οκτρεοτίδη. Το Sodium orthovanadate διατηρεί την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αναστέλλοντας τις ενδογενείς φωσφατάσες που βρίσκονται στο μείγμα. Το Sodium orthovanadate προστέθηκε για να αποδειχθεί εάν η αντι-νεοπλασματική δράση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα διέπετε μέσω της αναστολής των ενδογενών φωσφοτυροσυνικών φωσφατασών (PTPs). Στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29 έγινε επίσης επίδραση ίσης ποσότητας φυσιολογικού ορού ώστε να χρησιμοποιηθεί ως control. Μετά από 72h επώασης, 500µl από το MTT(2.5mg/ml) προστέθηκε σε κάθε well. Μετά από άλλες 4h επώασης, 150µl

DMSO προστέθηκε σε κάθε well. Τα 24-well plates ανακινήθηκε σε κλίση μπροστά και πίσω σε συγκεκριμένο μηχάνημα μέχρι το μπλε ίζημα κρυστάλλων να διαλυθεί πλήρως. Τέλος, 200μl από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε 96-well plate ώστε η απορρόφηση κάθε κυψέλης να μετρηθεί σε microplate reader στα 540nm με ένα μήκος κύματος αναφοράς 630nm. Κάθε επίδραση επαναλήφθηκε εις τριπλούν.

8.2.4 Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)

Το TRAP assay χρησιμοποιήθηκε για να εντοπίσει την ενεργότητα της τελομεράσης και στις δύο κυτταρικές σειρές ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Quantitative Telomerase Detection Kit-US Biomax, Inc.). Ζώντα κύτταρα διασπάστηκαν και από το εκχύλισμα των κυττάρων υπολογίστηκε η ενεργότητα της τελομεράσης, μέσω της ικανότητάς της να συνθέτει επαναλήψεις τελομερών πάνω σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο σε συνθήκες in-vitro μετά βεβαίως από την προσθήκη των κατάλληλων συνθηκών και dNTPs. Η τελομεράση από το εκχύλισμα των κυττάρων προσθέτει επαναλήψεις τελομερών πάνω σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο και τα εκτεταμένα πλέον παράγωγα, εν συνεχεία ενισχύθηκαν από την qPCR και έγιναν ορατά χρησιμοποιώντας SYBR Green dye. Όλα τα qPCR πειράματα διεξάχθηκαν στο Mx3000P real-time PCR Thermal cycler χρησιμοποιώντας το λογισμικό Version 2.00 (Stratagene, La Jolla, CA). Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της τελομεράσης, ένα θετικό control (TSR template), χρησιμοποιήθηκε για να παραχθεί το Standard curve η οποία αποτελείτο από 8 σειριακές διαλύσεις από 0.5μg/μL (3×10^5 μόρια/αντίδραση) έως 6.4×10^{-6} μg/μL (4 μόρια/αντίδραση)

8.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Reverse-transcription polymerase chain reaction - RT-PCR)

Το ολικό RNA αποσπάστηκε από τις κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29 χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRIzol. Το γενομικό DNA εξαλείφθηκε από την επώαση του RNA σε qDNA Wipeout Buffer στους 42°C για 2 λεπτά και το RNA χρησιμοποιήθηκε ακολούθως στην αντίστροφη μεταγραφή (RT). Η RT πραγματοποιήθηκε με 1μg ολικού RNA,

Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer και RT Primer Mix, ακολουθώντας της οδηγίες του κατασκευαστή. (Qiagen, Crawley, UK). Οι εκκινητές (primers) για τους υποδοχείς σωματοστατίνης επιλέχθηκαν από το NCBI UNISTS databank, και αυτοί για την σωματοστατίνη, χρησιμοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο άρθρο αυτό [594-596] (Πίνακας 10). Όλοι οι εκκινητές (primers) έχουν προμηθευτεί από την εταιρεία MWG (Ebersberg, Germany). Κάθε ζεύγος εκκινητών ελέγχθηκε με τουλάχιστον τρία διαφορετικά δείγματα RNA με ανεξάρτητες επιδράσεις. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε οδηγός για την αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας την platinum Taq DNA πολυμεράση της εταιρείας (Invitrogen, UK). Η ενίσχυση (Amplification) εκτελέσθηκε χρησιμοποιώντας τον Thermocycler (Biometra, Germany) όπως ακολούθως: 94°C για 2 λεπτά, 40 κύκλους των 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 55-60°C για 60 δευτερόλεπτα και 72°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από μια τελική περίοδο επιμήκυνσης των 10 λεπτών στους 72°C. Το GAPDH επίσης έτρεξε σαν ένα γονίδιο κανονικοποίησης. Με κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα και PCR χωρίς πρότυπο control. Τα παράγωγα της PCR ξεχωρίστηκαν και αποτυπώθηκαν σε ethidium bromide-stained 2% agarose gel με ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 10. Εκκινητές των υποδοχέων σωματοστατίνης sst1-5 και η σωματοστατίνη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της RT-PCR.

Gene name	Primer sequences
β -Actin	5'-GGTGGCTTTTAGGATGGCAAG-3' 5'-ACTGGAACGGTGAAGGTGACAG-3'
Sst1	5'-CCACCAACATCTACATCCTA-3' 5'-CCACCATCATCACCATTAAG-3'
Sst2	5'-CATCTTCTGCCTGACAGTC-3' 5'-CCACCACAAAGTCAAACAT-3'
Sst3	5'-AGAACGCCCTCTCCTACTGG-3' 5'-GTTGACGATGTTGAGCACG-3'
Sst4	5'-AACCTCGTTCGTGACCAG-3' 5'-AGCAGTGGCATAGTAGTCCAG-3'
Sst5	5'-GCTTCCAGAAGGTTCTGTGC-3' 5'-TTGCTGGTCTGCATAAGCC-3'
Somatostatin	5'-GTTTCTGCAGAAGTCCCTGG-3' 5'-AATTCTTGCAGCCAGCTTTG-3'

8.2.6 Ανοσοκυτταροχημεία - Immunocytochemistry (ICC)

Τα κύτταρα Caco-2 and HT-29 αναπτύχθηκαν σε poly-L-lysine-coated coverslips κατά την διάρκεια μιας νύχτας. Μετά τις κατάλληλες επιδράσεις με οκτρεοτίδη τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% paraformaldehyde και 0.2% picric acid σε phosphate buffer (pH 6.9) για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλύθηκαν πολλές φορές. Τα δείγματα διαποτίστηκαν και ακολούθως επωάστηκαν με 1 μg/ml από αντισώματα: anti-sst1, anti-sst2A, anti-sst2b, anti-sst3, anti-sst4 ή anti-sst5, ακολουθούμενα από δευτερογενή αντισώματα cyanine-conjugated της εταιρείας (Amersham, Braunschweig, Germany). Τα κύτταρα βάφτηκαν αντίθετα με 1μg/ml DAPI για 1 λεπτό, ξεπλύθηκαν με PBS και εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας το Leica TCS-NT laser scanning confocal microscope της εταιρείας (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) [597, 598].

8.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα φαίνονται σαν μέσες τιμές \pm σταθερή απόκλιση (mean \pm standard error του μέσου (SEM)). Όλα τα πειράματα εκτελέσθηκαν εις τριπλούν. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ δύο ομάδων υπολογίστηκε με two-tailed Student's t-test ή Two-Way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni test correction, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 (Graph Pad, Software, La Jolla CA, USA). Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας εκλάβαμε υπόψιν τις τιμές p-value <0.05 .

8.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.4.1 Η Οκτρεοτίδη καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου

Η οκτρεοτίδη με μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από την φυσική σωματοστατίνη, ανέστειλε την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς Caco-2 με τρόπο ανάλογο της δόσης, ξεκινώντας από συγκεντρώσεις 10^{-10} M. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν πιο έκδηλο στις 96h συγκριτικά με τις 48h επίδρασης ($p < 0.001$) (Σχήμα 36.A.). Ο πολλαπλασιασμός της κυτταρικής σειράς HT-29 επίσης μειώθηκε τόσο στις 48h όσο και στις 96h επίδρασης, με τρόπο ανάλογο της δόσης ($p < 0.001$) (Σχήμα 36.B.).

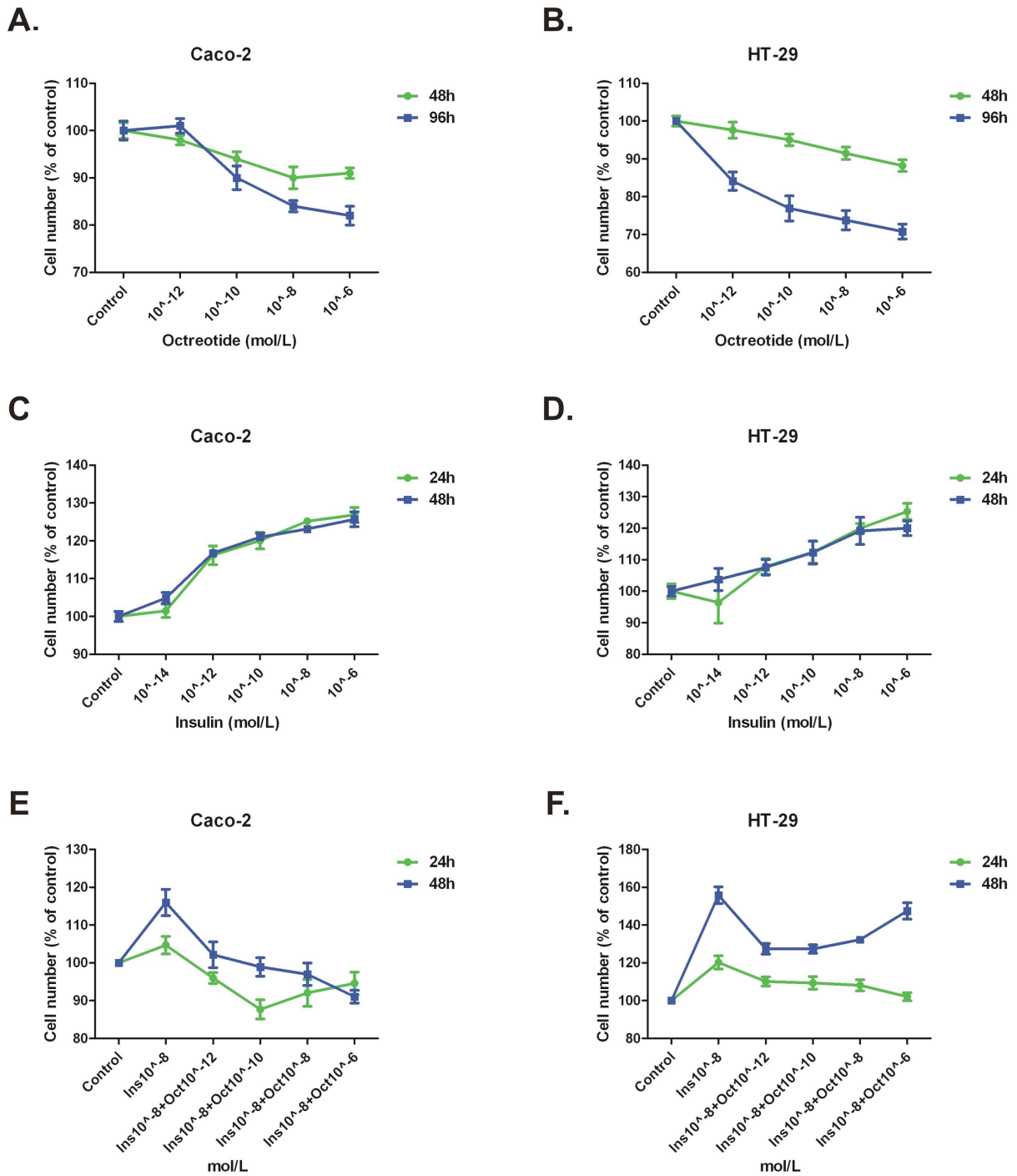
8.4.2 Η ινσουλίνη ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου

Η ινσουλίνη ενισχύει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Caco-2, με τρόπο ανάλογο της δόσης ($p < 0.001$) (Σχήμα 36.C.). Από την άλλη όμως, η δράση της ινσουλίνης στα κύτταρα HT-29 ήταν εμφανής σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (10^{-6} M) μετά από 24h επίδρασης ($p < 0.001$) (Σχήμα 36.D.)

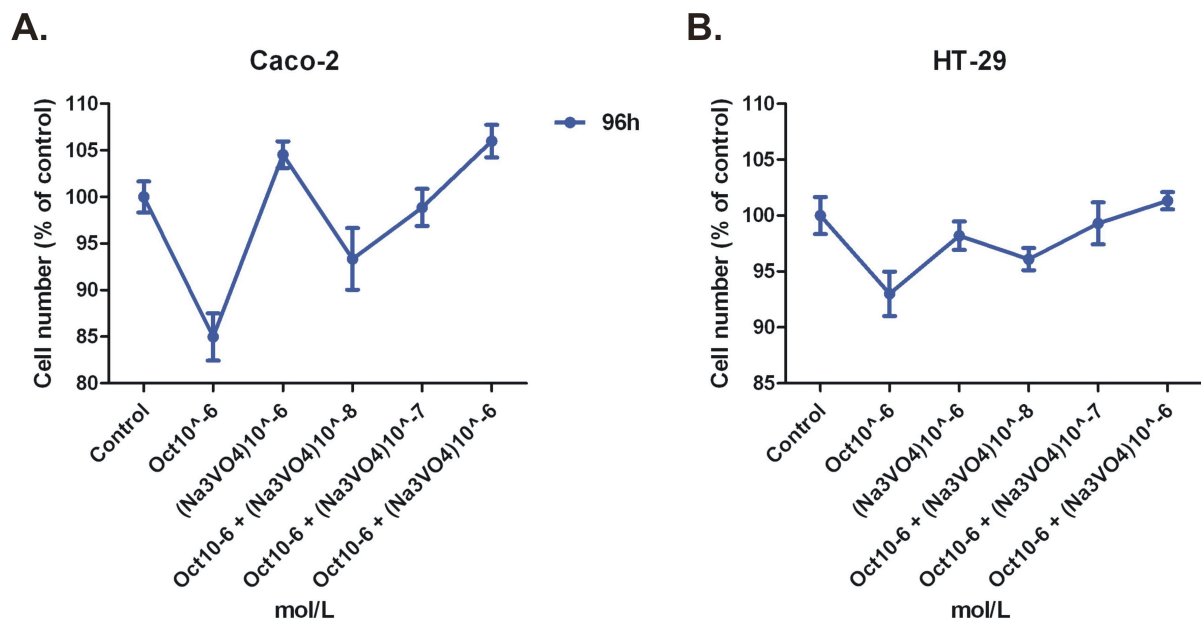
8.4.3 Η συνδυαστική δράση της ινσουλίνης και οκτρεοτίδης στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κύτταρων παχέος εντέρου και η ανασταλτική δράση της PTP

Η οκτρεοτίδη και η ινσουλίνη συνδυάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις οκτρεοτίδης και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Επιλέξαμε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση ινσουλίνης (10^{-8} M) για όλα τα συνδυαστικά πειράματα και για όλες τις χρονικές στιγμές (24-72h) γιατί είχαμε δει σε προηγούμενα πειράματα μας ότι αυτή η συγκέντρωση της ινσουλίνης είχε την καλύτερη δράση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων. Η οκτρεοτίδη ήταν ικανή να ανατρέψει την πολλαπλασιαστική δράση της ινσουλίνης σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκε στις 24h και στις 48h επίδρασης ($p < 0.05$). (Σχήμα 36.E-F).

Σχήμα 36. MTT cell proliferation assay στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29. Time-course οκτρεοτίδης σε συγκεντρώσεις (A-B), ινσουλίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις (C-D), συνδυασμός επίδρασης (ινσουλίνη και οκτρεοτίδη σε συγκεντρώσεις) (E-F).



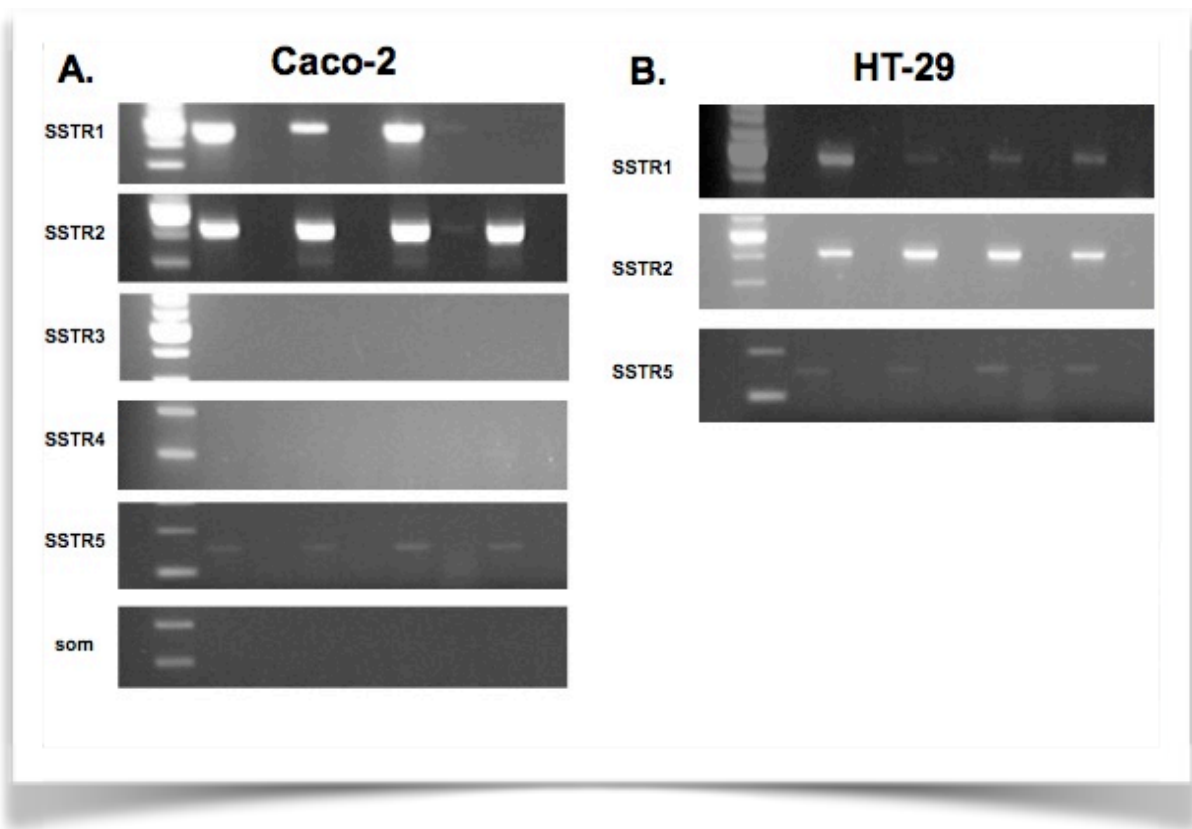
Όταν μαζί με την οκτρεοΐδη συνεπιδράσαμε το Orthovanadate Na_3VO_4 (PTP inhibitor – αναστολέα της πρωτεΐνης των τυροσινικών φωσφατασών), αυτό μπόρεσε να ανατρέψει την αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοΐδης ανάλογα με την δόση ($p < 0.05$) και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ το Na_3VO_4 από μόνο του δεν είχε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Σχήμα 37.A-B).



Σχήμα 37. MTT cell proliferation assay στα κύτταρα Caco-2 (A) και στα HT-29 (B). Χρονική στιγμή 96h, οκτρεοΐδης και orthovanadate (Na_3VO_4) σε διάφορες συγκεντρώσεις.

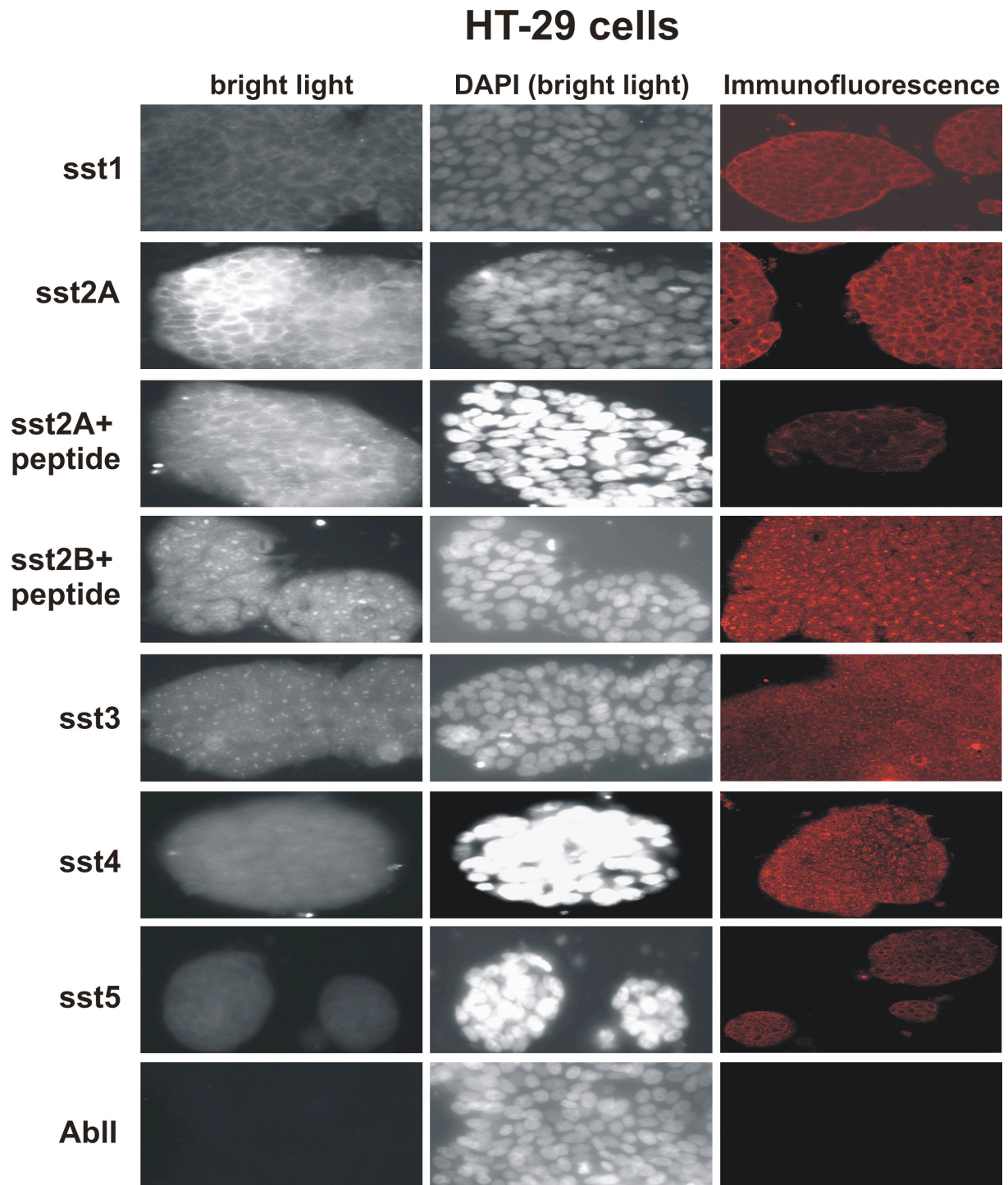
8.4.4 Έκφραση της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της

Η έκφραση της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της, sst_1 , sst_2 , sst_3 , sst_4 και sst_5 διερευνήθηκε στο επίπεδο του RNA και στις δύο κυτταρικές σειρές. Εκτός από τους δύο υποδοχείς sst_3 , sst_4 των οποίων το επίπεδο του RNA ήταν ελάχιστο, οι υπόλοιποι υποδοχείς σωματοστατίνης (sst_1 , sst_2 και sst_5) είχαν έντονη έκφραση με ελαφρά υπεροχή της έκφρασης στην Caco-2 καρκινική κυτταρική σειρά έναντι της HT-29 σειράς (Σχήμα 38.A-B).



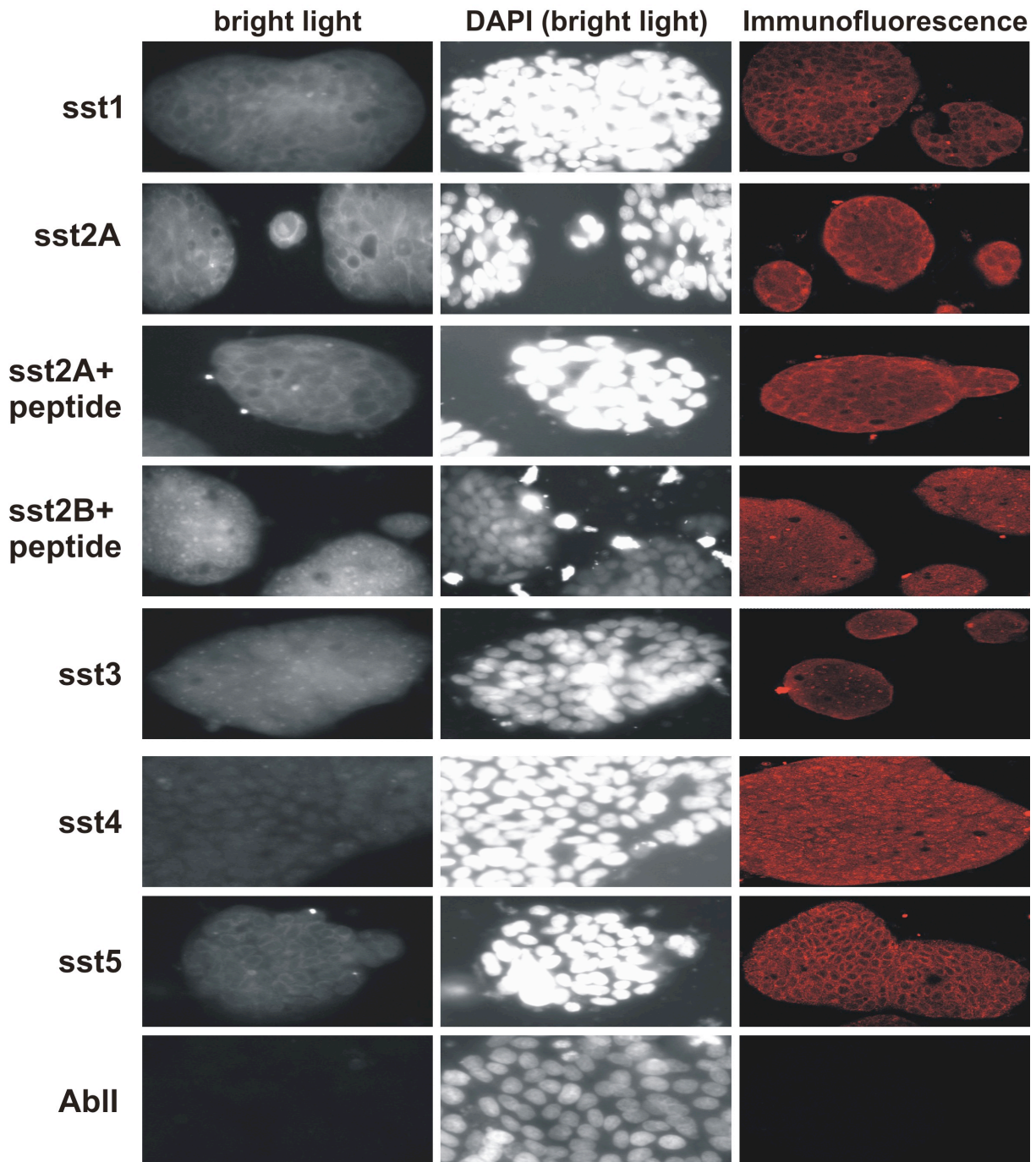
Σχήμα 38. Έκφραση *sst* mRNA στα κύτταρα Caco-2 (A) και HT-29 (B) χρησιμοποιώντας RT-PCR. Εκτός των *sst*₃ και *sst*₄ των οποίων τα επίπεδα RNA ήταν ελάχιστα, η έκφραση της σωματοστατίνης, των *sst*₁, *sst*₂ και *sst*₅ ήταν ιδιαίτερα υψηλή. Παρατηρείται εντονότερη έκφραση των υποδοχέων (*sst*₁, *sst*₂) στην Caco-2 καρκινική κυτταρική σειρά έναντι της HT-29 σειράς.

Η έκφραση όμως των πρωτεϊνικών υποδοχέων *sst*₁, *sst*_{2A}, *sst*_{2B}, *sst*₃, *sst*₄, *sst*₅ ανιχνεύθηκε με ανοσοφθορισμό στη μεμβράνη και των δύο κυτταρικών σειρών (Σχήμα 39A, B).



Σχήμα 39A. Ανοσοϊστοχημεία για τους υποδοχείς σωματοστατίνης στη κυτταρικής σειράς HT-29. Η έκφραση των πρωτεϊνών *sst*₁, *sst*_{2A}, *sst*_{2B}, *sst*₃, *sst*₄ and *sst*₅ εντοπίστηκε με ανοσοφθορισμό στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη της κυτταρικής σειράς με το confocal microscope.

Caco-2 cells



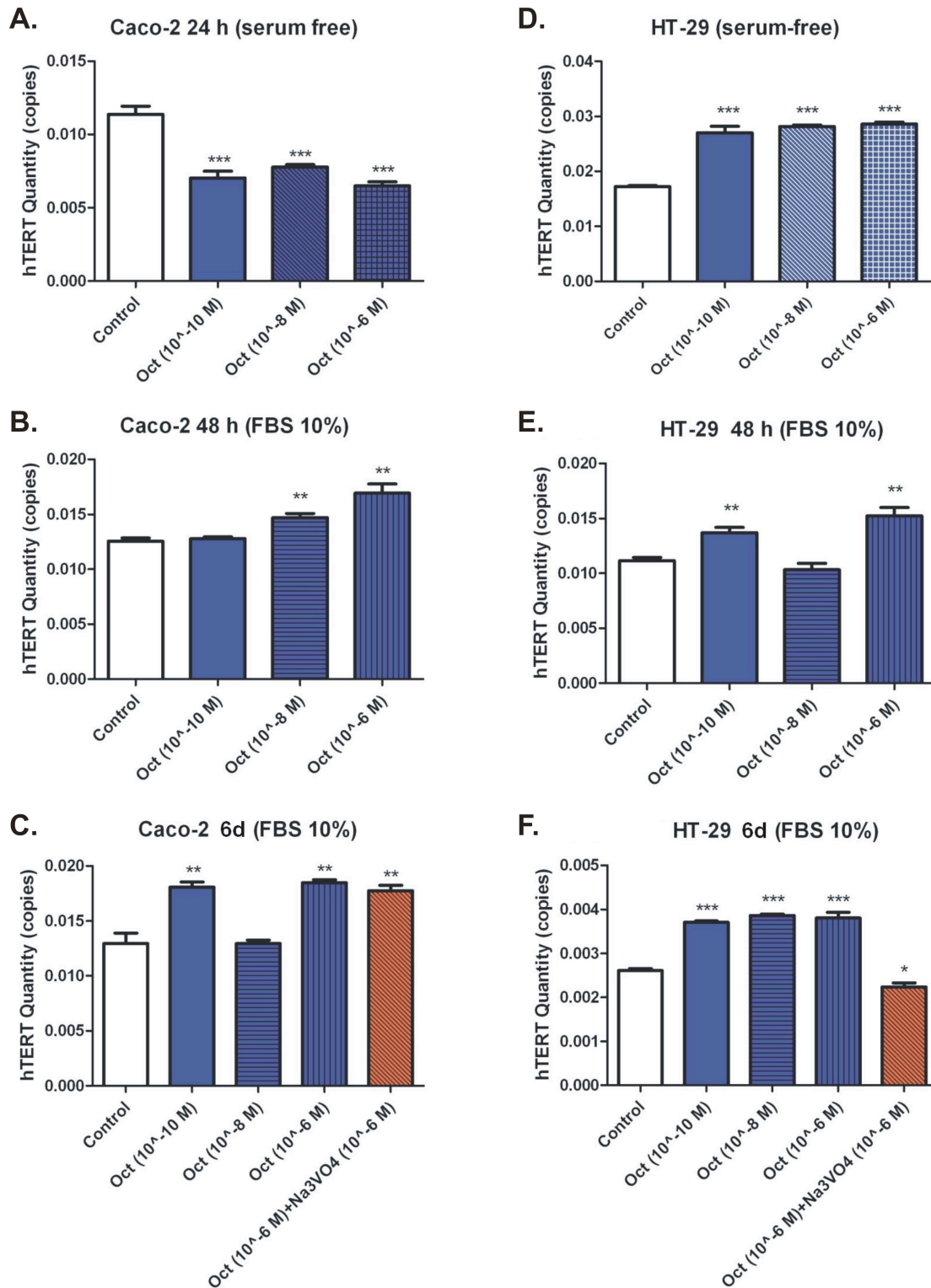
Σχήμα 39B. Σχήμα 39A. Ανοσοϊστοχημεία για τους υποδοχείς σωματοστατίνης στη κυτταρικής σειράς Caco-2. Η έκφραση των πρωτεϊνών *sst*₁, *sst*_{2A}, *sst*_{2B}, *sst*₃, *sst*₄ and *sst*₅ εντοπίστηκε με ανοσοφθορισμό στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη της κυτταρικής σειράς με το confocal microscope.

8.4.5 Η επίδραση της οκτρεοτίδης στην ενεργότητα της τελομεράσης

Προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε το μονοπάτι της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από θεραπεία με οκτρεοτίδη, μελετώντας την ενεργότητα της τελομεράσης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29.

Η ενεργότητα της τελομεράσης μειώθηκε σημαντικά όταν στα (serum-free) Caco-2 κύτταρα επιδράσαμε οκτρεοτίδη (10^{-10} - 10^{-6} M, ~0.65-fold, $p < 0.001$) (Σχήμα 40.A). Αντίθετα η οκτρεοτίδη ενίσχυσε την ενεργότητα της τελομεράσης στα Caco-2 κύτταρα που καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό 10%FBS μετά από 48h (octreotide 10^{-8} M, 1.35-fold, $p = 0.004$; οκτρεοτίδη 10^{-6} M, 1.47-fold, $p = 0.0027$) (Σχήμα 40.B). Ενίσχυση της ενεργότητας της τελομεράσης παρατηρήθηκε ακόμα μετά από 6 μέρες από την επίδραση της οκτρεοτίδης (10^{-10} M και 10^{-6} M, 1.45-fold, $p = 0.0029$ and $p = 0.0014$). Απρόσμενα το sodium orthovanadate Na_3VO_4 (10^{-6} M), σε συνδυασμό με οκτρεοτίδη (10^{-6} M), δεν φάνηκε να μπλοκάρει την “ενισχυτική” δράση της οκτρεοτίδης στην τελομεράση (1.38-fold, $p = 0.0042$) (Σχήμα 40.C).

Ενδιαφέρον είχε ότι η επίδραση της οκτρεοτίδης (10^{-10} - 10^{-6} M) ενίσχυσε σημαντικά την ενεργότητα της τελομεράσης στα (serum-free) HT-29 κύτταρα (~1.5-fold, $p < 0.001$) (Σχήμα 40.D). Επίσης η επίδραση της οκτρεοτίδης μετά από 48h ενίσχυσε την ενεργότητα της τελομεράσης στα HT-29 κύτταρα που καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό 10%FBS (οκτρεοτίδη 10^{-10} M, 1.21-fold, $p = 0.003$ | οκτρεοτίδη 10^{-6} M, 1.33-fold, $p = 0.0025$) (Σχήμα 40.E). Η επίδραση της οκτρεοτίδης ακόμα και μετά από 6 ημέρες επίσης ενίσχυσε την ενεργότητα της τελομεράσης (10^{-10} - 10^{-6} M, ~1.5-fold, $p < 0.001$). Το sodium orthovanadate (Na_3VO_4) μπλόκαρε την δράση της οκτρεοτίδης (10^{-6} M) και μείωσε δραματικά την ενεργότητα της τελομεράσης (0.86-fold, $p = 0.0105$) (Σχήμα 40.F).



Σχήμα 40. Η μέτρηση της ενεργότητας της τελομεράσης στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29, μετά την επίδραση οκτρεοτίδης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε συνθήκες serum-free (**A,D**) και σε θρεπτικό υλικό 10% FBS στις 24h και 48h αντίστοιχα (**B, C, E and F**). Η μέτρηση της ενεργότητας της τελομεράσης στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29 σε θρεπτικό υλικό 10% FBS, μετά από επίδραση οκτρεοτίδης και orthovanadate (Na₃VO₄) στις 6 ημέρες (**C and F**).

8.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Σωματοστατίνη (somatotropin release-inhibiting factor - SRIF) και το ανάλογό της η οκτρεοτίδη, δρουν μέσω έξι υποδοχέων σωματοστατίνης (sst_1 , sst_{2A} , sst_{2B} , sst_{3-5}), ο οποίοι ανήκουν στην υπέρ-οικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων G-protein coupled receptors και συνδέονται με πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια [399, 599]. Ενώ το μακράς διάρκειας δράσης ανάλογο σωματοστατίνης στοχεύει στους υποδοχείς σωματοστατίνης (sst), διαφέρει στην δεσμευτική συνάφεια με αυτούς τους υποδοχείς [600]. Η σωματοστατίνη δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια με όλους τους υποδοχείς σωματοστατίνης, ενώ η οκτρεοτίδη είναι εκλεκτική στον υποδοχέα sst_2 , δηλαδή στοχεύει στον υποδοχέα σωματοστατίνης υποτύπου 2 που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο καρκίνο παχέος εντέρου [600]. Η οκτρεοτίδη έχει επίσης μέτρια συγγένεια με τους υποδοχείς sst_3 , sst_5 [601]. Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην σηματοδότηση των sst και στην επίδραση τους στη κυτταρική ανάπτυξη. Οι υποδοχείς $sst_{1,4,5}$ έχει βρεθεί ότι προκαλούν καταστολή του κυτταρικού κύκλου, ενώ οι υποδοχείς sst_3 και λιγότερο ο sst_2 μπορεί να προκαλέσουν απόπτωση [602]. Επιπλέον οι $sst_{1,4,5}$ ρυθμίζουν το μονοπάτι των MAP κινασών και επάγουν την καταστολή κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, ενώ οι sst_3 & sst_2 προκαλούν απόπτωση μέσω μηχανισμών βασιζόμενων στο p53 ή όχι, αντίστοιχα [603]. Φαίνεται ότι η παρουσία των υποδοχέων σωματοστατίνης sst είναι σημαντική για την ανταπόκριση των όγκων στην επίδραση της οκτρεοτίδης [604]. Λόγω της πολλαπλότητας των δράσεων της, η σωματοστατίνη και τα ανάλογά της μπορούν να συνεισφέρουν στην διάγνωση του καρκίνου και στην θεραπεία μέσω πολλών μηχανισμών.

Ενδείξεις έχουν εμπλέξει την σωματοστατίνη στην αναστολή της ανάπτυξης και της εξέλιξης διαφόρων φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Οπότε τα ανάλογα της σωματοστατίνης ασκούν αντι νεοπλασματική δράση σε πλειάδα πειραματικών μοντέλων in-vivo και in-vitro [464, 605]. Κατά την διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας έχει αναφερθεί θεαματική αντι νεοπλασματική δράση της σωματοστατίνης και των ανάλογων αυτής, σε πολλά μοντέλα όγκων και καρκινικές κυτταρικές σειρές [606-612]. Παρόμοια αντι νεοπλασματική δράση έχει αναφερθεί και σε in-vitro πειράματα [603, 613-615]. Η σωματοστατίνη και το ανάλογό της, η οκτρεοτίδη, έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία

στην αντιμετώπιση νευροενδοκρινών όγκων και ασκούν αντι νεοπλασματική δράση σε ποικιλία κυτταρικών τύπων [401, 616-624].

Στην παρούσα μελέτη παρατηρούμε την καταστολή της ανάπτυξης δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου (Caco-2 και HT-29), μετά από την επίδραση οκτρεοτίδης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρονικές περιόδους. Όσον αφορά την γνώση μας, αυτή είναι η πρώτη αναφερόμενη περιγραφή μιας τέτοιας επίδρασης. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η καταστολή της ανάπτυξης στα κύτταρα Caco-2 όταν επιδράσει η οκτρεοτίδη, καταστέλλει την ενεργότητα της τελομεράσης, ενώ όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε 10% FBS, η οκτρεοτίδη ασκεί αντίθετη δράση ενισχύοντας την ενεργότητα της τελομεράσης. Αποδείξαμε επίσης ότι η κυτταρική σειρά HT-29 ανεξάρτητα με το μέσο καλλιέργειας επιδεικνύει μη αναμενόμενη ενίσχυση της ενεργότητας της τελομεράσης, μετά από επίδραση με οκτρεοτίδη.

Εικάζουμε ότι η οκτρεοτίδη μπορεί να αναστέλλει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό επιλεκτικά στην κυτταρική σειρά Caco-2, μειώνοντας την ενεργότητα της τελομεράσης, ενώ στην κυτταρική σειρά HT-29, φαίνεται να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω άλλων μοριακών μονοπατιών. Όπως εισηγήθηκαν οι Gao S, *et al.* 2003, [625] αυτό θα μπορούσε να είναι το μονοπάτι AKT/PI3K. Επιπρόσθετα οι Wang S, *et al.* 2013, [626] έδειξε ότι η οκτρεοτίδη αναστέλλει την ανάπτυξη της κολονικής καρκινικής σειράς SW480 μέσω της ρύθμισης του μονοπατιού Wnt/ β -catenin. Τα ευρήματα τους αποκαλύπτουν μια αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού Wnt/ β -catenin από πεπτιδικές ορμόνες G-protein-coupled receptors. Τα αποτελέσματα των Chen JS, *et al.* 2009, [627] επίσης έδειξαν ότι η οκτρεοτίδη μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του κολονικών καρκινικών κυττάρων, μέσω της αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/beta-catenin. Από την άλλη όμως, όταν η κυτταρική σειρά Caco-2 εκτέθηκε στην επίδραση της οκτρεοτίδης, όντας σε περιβάλλον καλλιέργειας 10% FBS, ενισχύθηκε η ενεργότητα της τελομεράσης. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στην κυτταρική σειρά HT-29. Οπότε όταν τα κύτταρα Caco-2 καλλιεργηθούν σε μέσο με 10% FBS, δείχνουν να εκφράζουν διαφορετικές ιδιότητες, συγκριτικά με όταν καλλιεργηθούν σε μέσο (serum-free). Ενδιαφέρον έχει ότι δεν

παρατηρείται το ίδιο αποτέλεσμα στα κύτταρα HT-29, στα οποία η επίδραση με οκτρεοτίδη ενισχύει την ενεργότητα της τελομεράσης, ανεξάρτητα του μέσου καλλιέργειας των κυττάρων.

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης των τυροσινικών φωσφατασών (PTPs) είναι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η σωματοστατίνη επάγει την αντι νεοπλασματική της δράση [603, 615]. Για να διερευνήσουμε αν οι PTP εμπλέκονται στα ενδοκυττάρια μονοπάτια που ρυθμίζουν την αντι νεοπλασματική δράση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα HT-29 και Caco-2, εμποδίσουμε την δράση της PTP, μελετώντας αν θα μπορούσε να ανατρέψει την αντι νεοπλασματική δράση της οκτρεοτίδης. Όπως αναμενόταν, ο αναστολέας της PTP (sodium orthovanadate Na_3VO_4) προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενη καταστολή της δράσης της οκτρεοτίδης και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μόνο του όμως, το sodium orthovanadate, δεν είχε καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δύο κυτταρικές σειρές. Είναι εμφανές ότι η αντι-νεοπλασματική δράση της οκτρεοτίδης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές επάγεται από το PTPs. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν στις κυτταρικές καρκινικές σειρές παγκρέατος με την δράση του TT-232 (ανάλογο σωματοστατίνης) [600, 614].

Παρόλα αυτά, αυτός μπορεί να μην είναι ο μοναδικός μηχανισμός. Η καταστολή που προκαλεί η οκτρεοτίδη στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του στομάχου, έχει συσχετιστεί με την ενεργότητα της τελομεράσης [625]. Οπότε προσδιορίζουμε την ενεργότητα της τελομεράσης των δικών μας καρκινικών κυτταρικών σειρών παχέος εντέρου μετά από την επίδραση οκτρεοτίδης. Τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Η οκτρεοτίδη πασιφανώς ανέστειλε την ενεργότητα της τελομεράσης στα Caco-2 κύτταρα, ενώ ενίσχυσε την ενεργότητα της τελομεράσης στα HT-29 κύτταρα. Στον ΟΚΚ αναφέρθηκε ότι η ενεργότητα της τελομεράσης ενεργοποιείται πολύ νωρίς στην διαδικασία της νόσου [628], ώστε να υπάρχει η εισήγηση ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης μπορεί να είναι καθοριστικός παράγοντας στην ογκογένεση. Δεν είναι ξεκάθαρο από την παρούσα μελέτη γιατί αυτή η ασυμφωνία θα μπορούσε να έχει συμβεί. Όπως και να έχει, αυτό μπορεί να εξηγήσει την ανθεκτικότητα των κυττάρων HT-29 στην δράση της οκτρεοτίδης.

Η τελομεράση είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA-πολυμεράση, η οποία αποτελείται από ένα RNA στοιχείο [629], που χρησιμεύει σαν πατρόν, την καταλυτική υπομονάδα, hTERT (human telomerase reverse transcriptase) και από μια πρωτεΐνη συσχετιζόμενη με την τελομεράση, άγνωστου λειτουργίας [259]. Η τελομεράση χρησιμοποιεί το δικό της πρότυπο RNA, ώστε να καταλύει την προσθήκη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών TTAGGG στο τέλος των χρωμοσωμάτων [630]. Στην απουσία της τελομεράσης, τα τελομερή μικραίνουν σε μέγεθος μετά από κάθε επιτυχημένη κυτταρική διαίρεση. Αυτό συμβαίνει γιατί η DNA polymerase- α , δεν μπορεί να αντιγράψει πλήρως το τελικό τμήμα του ευθύγραμμου DNA, με αποτέλεσμα να οδηγείται σε προοδευτική σμίκρυνση του τελικού τμήματος του τελομερούς στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα και φαίνεται να έχει συσχετιστεί με την περιορισμένη πολλαπλασιαστική δυνατότητα των φυσιολογικών κυττάρων [631]. Η ενεργότητα της τελομεράσης έχει εντοπιστεί σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% των καρκίνων στον άνθρωπο [629, 632, 633]. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η τελομεράση ενεργοποιείται πολύ νωρίς στην εξέλιξη της νόσου [502], έτσι ώστε να υπάρχει η εισήγηση ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης μπορεί να είναι καθοριστικός παράγοντας στην ογκογένεση. Στην παρούσα μελέτη, βρήκαμε ότι η ενεργότητα της τελομεράσης που μετρείται σε hTERT copies, μειώθηκε μετά την επίδραση οκτρεοτίδης σε κολονικά καρκινικά κύτταρα Caco-2 που καλλιεργούνταν σε περιβάλλον serum-free. Απροσδόκητα όμως, παρατηρήσαμε αντίθετα αποτελέσματα στην ενεργότητα της τελομεράσης μετά την επίδραση οκτρεοτίδης σε HT-29 κολονικά καρκινικά κύτταρα που καλλιεργούνταν σε περιβάλλον serum-free.

Οι Hu C, *et al.* 2004, [628] μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα $ss\tau_3$ σε διάφορες κυτταρικές σειρές του καρκίνου του στομάχου. Χρησιμοποιώντας ανοσοφθορισμό και Western-blot ανάλυση, αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη του υποδοχέα $ss\tau_3$ εκφραζόταν περισσότερο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές GES και SGC7901 από ότι στις σειρές AGS, ενώ δεν είχε κάποια έκφραση στις κυτταρικές σειρές MKN45. Στη δική μας μελέτη, οι δύο κολονικές καρκινικές σειρές (Caco-2 και HT-29) συμπεριφέρονταν διαφορετικά και επιδεικνύουν διαφορετικές ιδιότητες στην ενεργότητα της τελομεράσης μετά από την επίδραση της οκτρεοτίδης σε συνθήκες (serum-free). Αυτό μπορεί περαιτέρω να

εξηγηθεί, πέραν των διαφορετικών μονοπατιών που ακολουθεί η κάθε κυτταρική σειρά (όπως αναλύσαμε προηγουμένως), πιθανόν και από τα διαφορετικά προφίλ έκφρασης των διαφόρων υπότυπων σωματοστατίνης sst, ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές, και ιδιαίτερα του υποδοχέα sst₂ (υψηλή έκφραση στον ΟΚΚ) ο οποίος εκφραζόταν πιο έντονα στα Caco-2 συγκριτικά με τα HT-29 κύτταρα, με αποτέλεσμα να έχουμε και διαφορετική ανταπόκριση στην ενεργότητα τελομεράσης.

Αντιθέτως όμως, σε συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων με 10% FBS, και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές (Caco-2 & HT-29), ενισχύθηκε η ενεργότητα της τελομεράσης μετά από την επίδραση της οκτρεοτίδης. Το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, που περιέχει και ινσουλίνη, μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο επηρεάζοντας την δράση της οκτρεοτίδης. Μια άλλη εξήγηση μπορεί να είναι ότι η οκτρεοτίδη είναι λιγότερο ενεργής στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Οι Pawlikowski M, *et al.* 1998, [634] μελέτησαν τις διάφορες επιδράσεις της σωματοστατίνης και της οκτρεοτίδης στην τυροσινική κίνηση της υπόφυσης (PTK - pituitary tyrosin kinase) και έδειξε ότι στην περίπτωση των κολονικών καρκινικών σειρών η φυσική σωματοστατίνη είναι πιο αποτελεσματική στην αναστολή της PTK από ότι είναι η οκτρεοτίδη, η οποία είναι ενεργή μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (10⁻⁵M). Φαίνεται ότι οι όγκοι παχέος εκφράζουν λιγότερο τους υπότυπους της σωματοστατίνης που είναι πιο ευαίσθητοι στην οκτρεοτίδη. Αξίζει να ανακαλέσουμε ότι εν αντιθέσει με την οκτρεοτίδη, η φυσική σωματοστατίνη δεσμεύεται σχεδόν με την ίδια συγγένεια με όλους τους υπότυπους υποδοχέων σωματοστατίνης (sst-r) [634].

Όταν επιδράσαμε τον αναστολέα PTPs (Sodium Orthovanadate), αυτός προκάλεσε την μείωση της ενεργότητας της τελομεράσης, αναστρέφοντας πλήρως την δράση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα HT-29 τα οποία καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό 10% FBS. Απροσδόκητα και προς έκπληξη μας, το ίδιο δεν παρατηρήθηκε και στα κύτταρα Caco-2. Αυτό δείχνει ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τα κύτταρα Caco-2 και HT-29, συμπεριφέρονται διαφορετικά όσον αφορά την ενεργότητα της τελομεράσης. Με αυτή τη παρατήρηση λοιπόν μπορεί να υποθέσουμε ότι αυτές οι δύο κυτταρικές σειρές δεν προέρχονται από το ίδιο όργανο. Παρόλο που και οι δύο κυτταρικές σειρές προέρχονται από

πρωτοπαθές καρκίνο παχέος εντέρου, εντούτοις προέρχονται από διαφορετικούς ασθενείς. Τα **Caco-2** κύτταρα προέρχονται από γυναίκα ασθενή 44 ετών, ενώ τα **HT-29** κύτταρα προέρχονται από άνδρα ασθενή 72 ετών και το πιθανότερο είναι ότι **προέρχονται και από διαφορετικό σημείο του παχέος εντέρου**. Υπάρχουν ενδείξεις σήμερα που θεωρούν το παχύ έντερο και το ορθό σαν δύο ή τρία διαφορετικά όργανα αντί του ενός μοναδικού οργάνου, ως συνέπεια των διαφορετικών βιολογικών προφίλ και ιδιοτήτων ανάμεσα στις διάφορες θέσεις του παχέος εντέρου και του ορθού. Αυτό μπορεί να εξηγήσει και το ενδιαφέρον αυτό φαινόμενο των διαφορετικών ιδιοτήτων ανάμεσα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29.

Η ινσουλίνη και ο Insulin-like αυξητικός παράγον (IGF-1 & IGF-2) αποτελούν μια οικογένεια ορμονών/αυξητικών παραγόντων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη, την κυτταρική διαφοροποίηση και την επιβίωση των περισσότερων ιστών στα θηλαστικά. Η ινσουλίνη και ο (IGF-1) ξεκινούν την δράση τους μέσω υψηλών ομόλογων σηματοδοτικών συστημάτων. Οι υποδοχείς της ινσουλίνης και του IGF-1 είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των τυροσινικών κινασών [635]. Οι μηχανισμοί που κυβερνούν την ενεργοποίηση της τελομεράσης δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Πολλές μελέτες έχουν εισηγηθεί ένα σύνδεσμο μεταξύ των επιπέδων του IGF-I στον ορό και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου, περιλαμβάνοντας τον καρκίνο του προστάτη, του μαστού, του ορθοκολικού καρκίνου και του πνεύμονα [636-639]. Οι Wetterau LA, *et al.* 2003, [640] βρήκαν ότι ο IGF-I μπορεί δυνητικά να συνεισφέρει στην διαδικασία της κυτταρικής αθανатоποίησης, ρυθμίζοντας θετικά την ενεργότητα της τελομεράσης, οδηγώντας στην επιμήκυνση του τελομερούς και στην επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης των προστατικών καρκινικών κυττάρων. Οι Baron-Delage S, *et al.* 1994, [641] απέδειξαν ότι η ινσουλίνη έχει δυναμικό μιτογόνο στα Caco-2 κύτταρα το οποίο επάγεται ειδικά από τους δικούς της υποδοχείς. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ινσουλίνη είναι δυνατόν να διεγείρει ένα διαδραστικό μόριο του μιτογόνου μονοπατιού σε αυτό τον κυτταρικό τύπο, επάγοντας ένα γρήγορο και σταθερό ερέθισμα στην δραστηριότητα της MAP κινάσης [641].

Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψιν, μπορούμε πολύ καλά να εξηγήσουμε τα αποτελέσματά της μελέτης μας, στην οποία οι κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29 φαίνεται να επιδεικνύουν διαφορετικές ιδιότητες στην ενεργότητα της τελομεράσης, μετά από την επίδραση της οκτρεοτίδης, όταν οι κυτταρικές αυτές σειρές καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό 10% FBS, από ότι, όταν καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (Serum free). Το θρεπτικό υλικό 10% FBS εμπεριέχει ινσουλίνη, η οποία έχει ισχυρή μιτογονική/πολλαπλασιαστική επίδραση στα κολονικά κύτταρα. Η εξασθένηση της ενεργότητας της τελομεράσης που παρατηρήθηκε σε serum-free συνθήκες, μετά την επίδραση οκτρεοτίδης αναστράφηκε πλήρως όταν το υλικό καλλιέργειας αλλάχθηκε σε 10% FBS. Απροσδόκητα τότε η ενεργότητα της τελομεράσης ενισχύθηκε, παρόλη την αντι νεοπλασματική δράση της οκτρεοτίδης. Φαίνεται ότι η καταστολή που προκαλείται από την οκτρεοτίδη δεν μπορεί να υπερβεί την μιτογόνο επίδραση του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας (πιθανόν της ινσουλίνης ή/κ IGF-1), στην ενεργότητα της τελομεράσης και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, ή διαφορετικά η hTERT ίσως να ρυθμίζεται θετικά από τον IGF-1 μέσω του μονοπατιού Akt [640].

8.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οκτρεοτίδη επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυρίως μέσω PTP, ή μέσω σημάτων της τελομεράσης και αναστρέφει την πολλαπλασιαστική (τροφική) δράση της ινσουλίνης. Η χρήση της οκτρεοτίδης θα μπορούσε να παρέχει μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση ασθενών με ΟΚΚ σε συγκεκριμένη θέση του όγκου στο παχύ έντερο και στο ορθό, η οποία χρήζει περαιτέρω έρευνας και επιβεβαίωσης.

9. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Τα ευρήματα μας υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση της ύπαρξης των πολλαπλών μοριακών οντοτήτων στο ευρύ φάσμα του ΟΚΚ. Οι διαφορές που εμείς και άλλοι έχουμε βρει όσον αφορά την ενεργότητα της τελομεράσης, την έκφραση της COX-2, στο καρκίνο του παχέος έντερου και του ορθού, μπορεί να σχετίζονται με την ποικιλομορφία της καρκινογένεσης.

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εξέλιξη της νόσου στις διαφορετικές θέσεις του όγκου στο παχύ έντερο μπορεί να αποδοθούν στη ξεχωριστή εμβρυολογία, ανατομία, φυσιολογία, και μοριακή βιολογία του κάθε τμήματος του παχέος εντέρου και του ορθού. Μέσω των αποτελεσμάτων μας επιβεβαιώσαμε ότι το παχύ έντερο και το ορθό φαίνεται να αποτελούν ξεχωριστές οντότητες με διαφορετικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες.

Στοχευμένη θεραπεία έναντι της τελομεράσης ίσως θα πρέπει να δοθεί δεσμεύοντας κάποιους υποδοχείς των πολλών πρωτεϊνών πρόσφυσης της στο τελομερές, ιδιαίτερα στους καρκίνους του δεξιού κόλου στους οποίους η έκφραση hTERT βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη.

Η διαφορά στην έκφραση p53 μεταξύ δεξιού και αριστερού κόλου (και ορθού) σε συνδυασμό με την πιθανή προγνωστική σημασία του p53 (εφόσον αυτή επιβεβαιωθεί και με νέες μελέτες) θα συμβάλει ενδεχομένως στον καλύτερο σχεδιασμό της θεραπευτικής αγωγής μετά τη χειρουργική αντιμετώπιση, κυρίως της χημειοθεραπείας και ίσως και της ακτινοθεραπείας. Επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν και με ποιόν τρόπο η έκφραση του p53 θα μπορούσε να σχετίζεται με την απόκριση των ασθενών σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Έτσι η περαιτέρω διερεύνηση του θέματος σε συνδυασμό και με άλλους δείκτες ίσως τελικά επιτρέψει την επιλογή της πλέον κατάλληλης θεραπείας για κάθε ασθενή.

Επιπλέον η COX-2 φαίνεται να εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της εξέλιξης του ογκογενετικού μηχανισμού του ΟΚΚ και συγκεκριμένα επηρεάζοντας αρχικά τον ξενιστή του όγκου (μικροπεριβάλλον του στρώματος) στα φυσιολογικά κύτταρα και μετέπειτα στα

επιθηλιακά κύτταρα του ίδιου του όγκου. Στοχευμένη χημειοθεραπεία ίσως θα πρέπει να δοθεί για την πρόληψη και μόνο βλαβών του εντερικού επιθηλίου στο αριστερό κόλο ή το ορθό, τα οποία υπερεκφράζουν COX-2, παρά να δοθεί θεραπεία για την καταστολή της εξέλιξης του ΟΚΚ.

Τα δεδομένα της in-vitro μελέτης μας δείχνουν ότι η αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου, μειώνοντας την ινσουλίνη και τον IGF-1 (τροφικοί παράγοντες), ίσως καταστείλει την ογκογενετική εξέλιξη σε συγκεκριμένες τουλάχιστον περιοχές στο παχύ έντερο και το ορθό. Η χρήση της οκτρεοτίδης θα μπορούσε να παρέχει θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση ασθενών με ΟΚΚ σε συγκεκριμένες περιοχές του παχέος εντέρου και του ορθού.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, *et al.*: **Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006**. *Ann Oncol* **2007**, 18(3):581-592.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.*: **Global cancer statistics, 2002**. *CA Cancer J Clin* **2005**, 55(2):74-108.
3. Siesling S, van Dijck JA, Visser O, *et al.*: **Trends in incidence of and mortality from cancer in The Netherlands in the period 1989-1998**. *Eur J Cancer* **2003**, 39(17):2521-2530.
4. Menko FH, Griffioen G, Wijnen JT, *et al.*: **[Genetics of colorectal cancer. I. Non-polyposis and polyposis forms of hereditary colorectal cancer]**. *Ned Tijdschr Geneeskd* **1999**, 143(23):1201-1206.
5. Menko FH, Griffioen G, Wijnen JT, *et al.*: **[Genetics of colorectal cancer. II. Hereditary background of sporadic and familial colorectal cancer]**. *Ned Tijdschr Geneeskd* **1999**, 143(23):1207-1211.
6. Weitz J, Koch M, Debus J, *et al.*: **Colorectal cancer**. *Lancet* **2005**, 365(9454):153-165.
7. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, *et al.*: **Focus on colon cancer**. *Cancer Cell* **2002**, 1(3):233-236.
8. Lynch HT, de la Chapelle A: **Hereditary colorectal cancer**. *N Engl J Med* **2003**, 348(10):919-932.
9. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, *et al.*: **Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome**. *Int J Cancer* **1995**, 64(6):430-433.
10. de la Chapelle A: **Genetic predisposition to colorectal cancer**. *Nat Rev Cancer* **2004**, 4(10):769-780.
11. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, *et al.*: **Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors**. *Nat Genet* **2002**, 30(2):227-232.
12. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, *et al.*: **Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH**. *Lancet* **2003**, 362(9377):39-41.
13. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, *et al.*: **Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH**. *N Engl J Med* **2003**, 348(9):791-799.

14. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, *et al.*: **Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study.** *Cancer* **2001**, 91(4):854-862.
15. Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, *et al.*: **Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: factors determining risk.** *Gastroenterology* **1979**, 77(2):290-294.
16. Norat T, Bingham S, Ferrari P, *et al.*: **Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition.** *J Natl Cancer Inst* **2005**, 97(12):906-916.
17. Norat T, Lukanova A, Ferrari P, *et al.*: **Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies.** *Int J Cancer* **2002**, 98(2):241-256.
18. Tiemersma EW, Kampman E, Bueno de Mesquita HB, *et al.*: **Meat consumption, cigarette smoking, and genetic susceptibility in the etiology of colorectal cancer: results from a Dutch prospective study.** *Cancer Causes Control* **2002**, 13(4):383-393.
19. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, *et al.*: **Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men.** *J Natl Cancer Inst* **1995**, 87(4):265-273.
20. Kune GA, Vitetta L: **Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991.** *Nutr Cancer* **1992**, 18(2):97-111.
21. Giovannucci E, Martinez ME: **Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence.** *J Natl Cancer Inst* **1996**, 88(23):1717-1730.
22. Limburg PJ, Vierkant RA, Cerhan JR, *et al.*: **Cigarette smoking and colorectal cancer: long-term, subsite-specific risks in a cohort study of postmenopausal women.** *Clin Gastroenterol Hepatol* **2003**, 1(3):202-210.
23. Terry P, Ekobom A, Lichtenstein P, *et al.*: **Long-term tobacco smoking and colorectal cancer in a prospective cohort study.** *Int J Cancer* **2001**, 91(4):585-587.
24. Trock B, Lanza E, Greenwald P: **Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence.** *J Natl Cancer Inst* **1990**, 82(8):650-661.
25. Gerhardsson de Verdier M, Steineck G, Hagman U, *et al.*: **Physical activity and colon cancer: a case-referent study in Stockholm.** *Int J Cancer* **1990**, 46(6):985-989.
26. Mao Y, Pan S, Wen SW, *et al.*: **Physical inactivity, energy intake, obesity and the risk of rectal cancer in Canada.** *Int J Cancer* **2003**, 105(6):831-837.
27. Slattery ML, Edwards S, Curtin K, *et al.*: **Physical activity and colorectal cancer.** *Am J Epidemiol* **2003**, 158(3):214-224.

28. Michels KB, Edward G, Joshipura KJ, *et al.*: **Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers.** *J Natl Cancer Inst* **2000**, 92(21):1740-1752.
29. Michels KB, Fuchs CS, Giovannucci E, *et al.*: **Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2005**, 14(4):842-849.
30. Potter JD: **Colorectal cancer: molecules and populations.** *J Natl Cancer Inst* **1999**, 91(11):916-932.
31. Cucino C, Buchner AM, Sonnenberg A: **Continued rightward shift of colorectal cancer.** *Dis Colon Rectum* **2002**, 45(8):1035-1040.
32. Levi F, Randimbison L, La Vecchia C: **Trends in subsite distribution of colorectal cancers and polyps from the Vaud Cancer Registry.** *Cancer* **1993**, 72(1):46-50.
33. Compton CC, Greene FL: **The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond.** *CA Cancer J Clin* **2004**, 54(6):295-308.
34. Greene FL: **TNM staging for malignancies of the digestive tract: 2003 changes and beyond.** *Semin Surg Oncol* **2003**, 21(1):23-29.
35. Morson BC: **Evolution of cancer of the colon and rectum.** *Cancer* **1974**, 34(3):suppl:845-849.
36. Muto T, Bussey HJ, Morson BC: **The evolution of cancer of the colon and rectum.** *Cancer* **1975**, 36(6):2251-2270.
37. Shinya H, Wolff WI: **Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps.** *Ann Surg* **1979**, 190(6):679-683.
38. Muto T, Kamiya J, Sawada T, *et al.*: **Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features.** *Dis Colon Rectum* **1985**, 28(11):847-851.
39. Rubio CA, Kumagai J, Kanamori T, *et al.*: **Flat adenomas and flat adenocarcinomas of the colorectal mucosa in Japanese and Swedish patients. Comparative histologic study.** *Dis Colon Rectum* **1995**, 38(10):1075-1079.
40. Stolte M, Bethke B: **Colorectal mini-de novo carcinoma: a reality in Germany too.** *Endoscopy* **1995**, 27(4):286-290.
41. Wolber RA, Owen DA: **Flat adenomas of the colon.** *Hum Pathol* **1991**, 22(1):70-74.
42. Jass JR, Whitehall VL, Young J, *et al.*: **Emerging concepts in colorectal neoplasia.** *Gastroenterology* **2002**, 123(3):862-876.
43. Knudson AG, Jr.: **Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1971**, 68(4):820-823.
44. Fearon ER, Vogelstein B: **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell* **1990**, 61(5):759-767.

45. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* **2000**, 100(1):57-70.
46. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, *et al.*: **Genetic instability and darwinian selection in tumours.** *Trends Cell Biol* **1999**, 9(12):M57-60.
47. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, *et al.*: **Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer.** *World J Gastroenterol* **2007**, 13(28):3784-3791.
48. Worthley DL, Leggett BA: **Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities.** *Clin Biochem Rev* **2010**, 31(2):31-38.
49. Grady WM, Carethers JM: **Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis.** *Gastroenterology* **2008**, 135(4):1079-1099.
50. Walther A, Houlston R, Tomlinson I: **Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis.** *Gut* **2008**, 57(7):941-950.
51. Pritchard CC, Grady WM: **Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice.** *Gut* **2011**, 60(1):116-129.
52. Rowan A, Halford S, Gaasenbeek M, *et al.*: **Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis.** *Clin Gastroenterol Hepatol* **2005**, 3(11):1115-1123.
53. Bellam N, Pasche B: **Tgf-beta signaling alterations and colon cancer.** *Cancer Treat Res* **2010**, 155:85-103.
54. Chow E, Macrae F: **A review of juvenile polyposis syndrome.** *J Gastroenterol Hepatol* **2005**, 20(11):1634-1640.
55. Jiang Y, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, *et al.*: **Assessment of K-ras mutation: a step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer.** *Cancer* **2009**, 115(16):3609-3617.
56. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, *et al.*: **A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss.** *Cell* **2009**, 137(4):623-634.
57. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, de Wit M, *et al.*: **Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenoma-to-carcinoma progression.** *Tumour Biol* **2010**, 31(2):89-96.
58. Kennell J, Cadigan KM: **APC and beta-catenin degradation.** *Adv Exp Med Biol* **2009**, 656:1-12.
59. Sena P, Saviano M, Monni S, *et al.*: **Subcellular localization of beta-catenin and APC proteins in colorectal preneoplastic and neoplastic lesions.** *Cancer Lett* **2006**, 241(2):203-212.
60. Saif MW, Shah M: **K-ras mutations in colorectal cancer: a practice changing discovery.** *Clin Adv Hematol Oncol* **2009**, 7(1):45-53, 64.

61. Yuen ST, Davies H, Chan TL, *et al.*: **Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia.** *Cancer Res* **2002**, 62(22):6451-6455.
62. Wang JY, Wang YH, Jao SW, *et al.*: **Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene.** *Oncol Rep* **2006**, 16(6):1245-1252.
63. Velho S, Moutinho C, Cirnes L, *et al.*: **BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis?** *BMC Cancer* **2008**, 8:255.
64. Jancik S, Drabek J, Radzioch D, *et al.*: **Clinical relevance of KRAS in human cancers.** *J Biomed Biotechnol* **2010**, 2010:150960.
65. Boland CR, Shin SK, Goel A: **Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer.** *Yonsei Med J* **2009**, 50(3):309-321.
66. Kim JC, Choi JS, Roh SA, *et al.*: **Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas.** *Ann Surg Oncol* **2010**, 17(7):1767-1776.
67. Boland CR, Goel A: **Microsatellite instability in colorectal cancer.** *Gastroenterology* **2010**, 138(6):2073-2087 e2073.
68. Vilar E, Gruber SB: **Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence.** *Nat Rev Clin Oncol* **2010**, 7(3):153-162.
69. Shah SN, Hile SE, Eckert KA: **Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes.** *Cancer Res* **2010**, 70(2):431-435.
70. Pouligiannis G, Frayling IM, Arends MJ: **DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome.** *Histopathology* **2010**, 56(2):167-179.
71. Bellizzi AM, Frankel WL: **Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review.** *Adv Anat Pathol* **2009**, 16(6):405-417.
72. Auclair J, Vaissiere T, Desseigne F, *et al.*: **Intensity-dependent constitutional MLH1 promoter methylation leads to early onset of colorectal cancer by affecting both alleles.** *Genes Chromosomes Cancer* **2011**, 50(3):178-185.
73. Walther A, Johnstone E, Swanton C, *et al.*: **Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer.** *Nat Rev Cancer* **2009**, 9(7):489-499.
74. Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, *et al.*: **Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors.** *Dis Markers* **2004**, 20(4-5):237-250.

75. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, *et al.*: **Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data.** *Eur J Cancer* **2010**, 46(15):2788-2798.
76. Sheffer M, Bacolod MD, Zuk O, *et al.*: **Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106(17):7131-7136.
77. Leggett B, Whitehall V: **Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis.** *Gastroenterology* **2010**, 138(6):2088-2100.
78. Farris AB, Misdraji J, Srivastava A, *et al.*: **Sessile serrated adenoma: challenging discrimination from other serrated colonic polyps.** *Am J Surg Pathol* **2008**, 32(1):30-35.
79. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, *et al.*: **Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points.** *Am J Surg Pathol* **2006**, 30(12):1491-1501.
80. Harvey NT, Ruszkiewicz A: **Serrated neoplasia of the colorectum.** *World J Gastroenterol* **2007**, 13(28):3792-3798.
81. Yang S, Farraye FA, Mack C, *et al.*: **BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status.** *Am J Surg Pathol* **2004**, 28(11):1452-1459.
82. Sandmeier D, Benhattar J, Martin P, *et al.*: **Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps.** *Histopathology* **2009**, 55(2):206-213.
83. Vakiani E, Yantiss RK: **Pathologic features and biologic importance of colorectal serrated polyps.** *Adv Anat Pathol* **2009**, 16(2):79-91.
84. Pratilas CA, Solit DB: **Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response.** *Clin Cancer Res* **2010**, 16(13):3329-3334.
85. Minoo P, Moyer MP, Jass JR: **Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis.** *J Pathol* **2007**, 212(2):124-133.
86. Wellbrock C, Hurlstone A: **BRAF as therapeutic target in melanoma.** *Biochem Pharmacol* **2010**, 80(5):561-567.
87. Nagasaka T, Koi M, Kloor M, *et al.*: **Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer.** *Gastroenterology* **2008**, 134(7):1950-1960, 1960 e1951.
88. Chan TL, Zhao W, Leung SY, *et al.*: **BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas.** *Cancer Res* **2003**, 63(16):4878-4881.

89. Young J, Jenkins M, Parry S, *et al.*: **Serrated pathway colorectal cancer in the population: genetic consideration.** *Gut* **2007**, 56(10):1453-1459.
90. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, *et al.*: **Inflammation and colon cancer.** *Gastroenterology* **2010**, 138(6):2101-2114 e2105.
91. Harpaz N, Polydorides AD: **Colorectal dysplasia in chronic inflammatory bowel disease: pathology, clinical implications, and pathogenesis.** *Arch Pathol Lab Med* **2010**, 134(6):876-895.
92. Westbrook AM, Szakmary A, Schiestl RH: **Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models.** *Mutat Res* **2010**, 705(1):40-59.
93. Zisman TL, Rubin DT: **Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* **2008**, 14(17):2662-2669.
94. Kitamura T, Itoh M, Noda T, *et al.*: **Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice.** *Int J Cancer* **2004**, 109(4):576-580.
95. Doherty GA, Byrne SM, Molloy ES, *et al.*: **Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer.** *BMC Cancer* **2009**, 9:207.
96. Wang D, Dubois RN: **Prostaglandins and cancer.** *Gut* **2006**, 55(1):115-122.
97. Banu N, Buda A, Chell S, *et al.*: **Inhibition of COX-2 with NS-398 decreases colon cancer cell motility through blocking epidermal growth factor receptor transactivation: possibilities for combination therapy.** *Cell Prolif* **2007**, 40(5):768-779.
98. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, *et al.*: **Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps.** *Cancer Res* **2002**, 62(2):506-511.
99. Lawrence T: **The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2009**, 1(6):a001651.
100. Balkwill F: **TNF-alpha in promotion and progression of cancer.** *Cancer Metastasis Rev* **2006**, 25(3):409-416.
101. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR: **Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter.** *Eur J Cancer* **2006**, 42(6):745-750.
102. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, *et al.*: **Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis.** *J Clin Invest* **2008**, 118(2):560-570.

103. Fiorino G, Rovida S, Correale C, *et al.*: **Emerging biologics in the treatment of inflammatory bowel disease: what is around the corner?** *Curr Drug Targets* **2010**, 11(2):249-260.
104. Testro AG, Visvanathan K: **Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease.** *J Gastroenterol Hepatol* **2009**, 24(6):943-954.
105. Huang B, Zhao J, Li H, *et al.*: **Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance.** *Cancer Res* **2005**, 65(12):5009-5014.
106. Fukata M, Abreu MT: **Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies.** *Oncogene* **2008**, 27(2):234-243.
107. Goldstein NS: **Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification.** *Am J Clin Pathol* **2006**, 125(1):146-153.
108. Kwong LN, Dove WF: **APC and its modifiers in colon cancer.** *Adv Exp Med Biol* **2009**, 656:85-106.
109. Tighe A, Johnson VL, Taylor SS: **Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability.** *J Cell Sci* **2004**, 117(Pt 26):6339-6353.
110. Goldstein NS, Bhanot P, Odish E, *et al.*: **Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas.** *Am J Clin Pathol* **2003**, 119(6):778-796.
111. Xu Y, Pasche B: **TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer.** *Hum Mol Genet* **2007**, 16 Spec No 1:R14-20.
112. Akhurst RJ: **TGF beta signaling in health and disease.** *Nat Genet* **2004**, 36(8):790-792.
113. Derynck R, Zhang YE: **Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.** *Nature* **2003**, 425(6958):577-584.
114. Trobridge P, Knoblaugh S, Washington MK, *et al.*: **TGF-beta receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a beta-catenin-independent pathway.** *Gastroenterology* **2009**, 136(5):1680-1688 e1687.
115. Ogino S, Kawasaki T, Ogawa A, *et al.*: **TGFBR2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer.** *Hum Pathol* **2007**, 38(4):614-620.
116. Gulubova M, Manolova I, Ananiev J, *et al.*: **Role of TGF-beta1, its receptor TGFbetaRII, and Smad proteins in the progression of colorectal cancer.** *Int J Colorectal Dis* **2010**, 25(5):591-599.

117. Popat S, Houlston RS: **A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis.** *Eur J Cancer* **2005**, 41(14):2060-2070.
118. Kern A, Taubert H, Scheele J, *et al.*: **Association of p53 mutations, microvessel density and neoangiogenesis in pairs of colorectal cancers and corresponding liver metastases.** *Int J Oncol* **2002**, 21(2):243-249.
119. Molchadsky A, Rivlin N, Brosh R, *et al.*: **p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention.** *Carcinogenesis* **2010**, 31(9):1501-1508.
120. Sakasai R, Teraoka H, Takagi M, *et al.*: **Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison.** *J Biol Chem* **2010**, 285(20):15201-15208.
121. Farnebo M, Bykov VJ, Wiman KG: **The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, 396(1):85-89.
122. Lo HW: **Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications.** *Discov Med* **2010**, 10(50):44-51.
123. Saif MW: **Colorectal cancer in review: the role of the EGFR pathway.** *Expert Opin Investig Drugs* **2010**, 19(3):357-369.
124. Roda JM, Joshi T, Butchar JP, *et al.*: **The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines.** *Clin Cancer Res* **2007**, 13(21):6419-6428.
125. Bansal A, Liu X, McGregor DH, *et al.*: **Correlation of epidermal growth factor receptor with morphological features of colorectal advanced adenomas: a pilot correlative case series.** *Am J Med Sci* **2010**, 340(4):296-300.
126. Shankaran V, Obel J, Benson AB, 3rd: **Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions.** *Oncologist* **2010**, 15(2):157-167.
127. Winawer SJ: **The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Colorectal cancer screening.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2007**, 21(6):1031-1048.
128. Booth RA: **Minimally invasive biomarkers for detection and staging of colorectal cancer.** *Cancer Lett* **2007**, 249(1):87-96.
129. White V, Scarpini C, Barbosa-Morais NL, *et al.*: **Isolation of stool-derived mucus provides a high yield of colonocytes suitable for early detection of colorectal carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2009**, 18(7):2006-2013.

130. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, *et al.*: **Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer.** *Cancer Res* **1995**, 55(9):1811-1816.
131. Boynton KA, Summerhayes IC, Ahlquist DA, *et al.*: **DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer.** *Clin Chem* **2003**, 49(7):1058-1065.
132. Kim HJ, Yu MH, Kim H, *et al.*: **Noninvasive molecular biomarkers for the detection of colorectal cancer.** *BMB Rep* **2008**, 41(10):685-692.
133. Oliveira C, Velho S, Moutinho C, *et al.*: **KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression.** *Oncogene* **2007**, 26(1):158-163.
134. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, *et al.*: **Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression.** *J Cell Physiol* **2005**, 204(2):484-488.
135. Fakhri MG, Padmanabhan A: **CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know.** *Oncology (Williston Park)* **2006**, 20(6):579-587; discussion 588, 594, 596 passim.
136. Tan E, Gouvas N, Nicholls RJ, *et al.*: **Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer.** *Surg Oncol* **2009**, 18(1):15-24.
137. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, *et al.*: **Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population.** *N Engl J Med* **2004**, 351(26):2704-2714.
138. Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, *et al.*: **Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia.** *Ann Intern Med* **2008**, 149(7):441-450, W481.
139. Ogino S, Kirkner GJ, Nosho K, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer.** *Clin Cancer Res* **2008**, 14(24):8221-8227.
140. Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* **2004**, 10(24):8465-8471.
141. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, *et al.*: **CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer.** *Gut* **2009**, 58(1):90-96.
142. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, *et al.*: **Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* **2007**, 13(13):3831-3839.
143. Chang SC, Lin JK, Yang SH, *et al.*: **Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer.** *Int J Cancer* **2006**, 118(7):1721-1727.

144. Russo A, Bazan V, Agnese V, *et al.*: **Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies.** *Ann Oncol* **2005**, 16 Suppl 4:iv44-49.
145. Popat S, Hubner R, Houlston RS: **Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis.** *J Clin Oncol* **2005**, 23(3):609-618.
146. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, *et al.*: **A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy.** *Oncologist* **2010**, 15(7):699-731.
147. Lombardi L, Morelli F, Cinieri S, *et al.*: **Adjuvant colon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go.** *Cancer Treat Rev* **2010**, 36 Suppl 3:S34-41.
148. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, *et al.*: **Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR.** *Cancer Treat Rev* **2009**, 35(3):262-271.
149. Pommier Y: **DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition.** *Chem Rev* **2009**, 109(7):2894-2902.
150. Vallbohmer D, Iqbal S, Yang DY, *et al.*: **Molecular determinants of irinotecan efficacy.** *Int J Cancer* **2006**, 119(10):2435-2442.
151. Braun MS, Richman SD, Quirke P, *et al.*: **Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial.** *J Clin Oncol* **2008**, 26(16):2690-2698.
152. Pohl A, Lenz HJ: **Individualization of therapy for colorectal cancer based on clinical and molecular parameters.** *Gastrointest Cancer Res* **2008**, 2(4 Suppl):S38-41.
153. Mills SJ, Mathers JC, Chapman PD, *et al.*: **Colonic crypt cell proliferation state assessed by whole crypt microdissection in sporadic neoplasia and familial adenomatous polyposis.** *Gut* **2001**, 48(1):41-46.
154. Anti M, Armuzzi A, Morini S, *et al.*: **Severe imbalance of cell proliferation and apoptosis in the left colon and in the rectosigmoid tract in subjects with a history of large adenomas.** *Gut* **2001**, 48(2):238-246.
155. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, *et al.*: **Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.** *Int J Cancer* **1983**, 31(1):13-20.
156. Baik SY, Yun HS, Lee HJ, *et al.*: **Identification of stathmin 1 expression induced by Epstein-Barr virus in human B lymphocytes.** *Cell Prolif* **2007**, 40(2):268-281.
157. Brown DC, Gatter KC: **Ki67 protein: the immaculate deception?** *Histopathology* **2002**, 40(1):2-11.

158. Brown DC, Gatter KC: **Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology.** *Histopathology* **1990**, 17(6):489-503.
159. Key G, Becker MH, Baron B, *et al.*: **New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope.** *Lab Invest* **1993**, 68(6):629-636.
160. Kubota Y, Petras RE, Easley KA, *et al.*: **Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis.** *Cancer* **1992**, 70(11):2602-2609.
161. van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, *et al.*: **Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells.** *Am J Clin Pathol* **1998**, 110(1):24-31.
162. Duchrow M, Ziemann T, Windhovel U, *et al.*: **Colorectal carcinomas with high MIB-1 labelling indices but low pKi67 mRNA levels correlate with better prognostic outcome.** *Histopathology* **2003**, 42(6):566-574.
163. Sun XF, Carstensen JM, Stal O, *et al.*: **Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in relation to ras, c-erbB-2,p53, clinico-pathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinoma.** *Int J Cancer* **1996**, 69(1):5-8.
164. Chen YT, Henk MJ, Carney KJ, *et al.*: **Prognostic significance of tumor markers in colorectal cancer patients: DNA index, S-phase fraction, p53 expression, and Ki-67 index.** *J Gastrointest Surg* **1997**, 1(3):266-272; discussion 273.
165. Palmqvist R, Sellberg P, Oberg A, *et al.*: **Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers.** *Br J Cancer* **1999**, 79(3-4):577-581.
166. Kyzer S, Gordon PH: **Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67.** *Dis Colon Rectum* **1997**, 40(3):322-325.
167. Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, *et al.*: **Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases.** *Eur J Surg Oncol* **2001**, 27(1):80-87.
168. Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, *et al.*: **Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer.** *Cancer Lett* **2004**, 207(1):109-115.
169. Patchett SE, Alstead EM, Saunders BP, *et al.*: **Regional proliferative patterns in the colon of patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer.** *Dis Colon Rectum* **1997**, 40(2):168-171.
170. Hilska M, Collan YU, VJ OL, *et al.*: **The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer.** *Dis Colon Rectum* **2005**, 48(12):2197-2208.

171. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: **BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.** *Genes Dev* **1999**, 13(15):1899-1911.
172. Chen-Levy Z, Nourse J, Cleary ML: **The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation.** *Mol Cell Biol* **1989**, 9(2):701-710.
173. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, *et al.*: **Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.** *Nature* **1990**, 348(6299):334-336.
174. Korsmeyer SJ: **Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death.** *Blood* **1992**, 80(4):879-886.
175. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, *et al.*: **BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88(16):6961-6965.
176. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, *et al.*: **bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma.** *N Engl J Med* **1993**, 329(10):690-694.
177. Henriksen R, Wilander E, Oberg K: **Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours.** *Br J Cancer* **1995**, 72(5):1324-1329.
178. Viale G, Roncalli M, Grimelius L, *et al.*: **Prognostic value of bcl-2 immunoreactivity in medullary thyroid carcinoma.** *Hum Pathol* **1995**, 26(9):945-950.
179. Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS: **Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas.** *Cancer* **1995**, 75(9):2209-2213.
180. Colombel M, Symmans F, Gil S, *et al.*: **Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers.** *Am J Pathol* **1993**, 143(2):390-400.
181. Reed JC, Meister L, Tanaka S, *et al.*: **Differential expression of bcl2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin.** *Cancer Res* **1991**, 51(24):6529-6538.
182. Bosari S, Moneghini L, Graziani D, *et al.*: **bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas.** *Hum Pathol* **1995**, 26(5):534-540.
183. Flohil CC, Janssen PA, Bosman FT: **Expression of Bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon.** *J Pathol* **1996**, 178(4):393-397.
184. Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H, *et al.*: **Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature.** *Crit Rev Oncol Hematol* **2003**, 45(1):37-53.

185. Mosnier JF, Perret AG, Vindimian M, *et al.*: **An immunohistochemical study of the simultaneous expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumors of the colon and rectum.** *Arch Pathol Lab Med* **1996**, 120(7):654-659.
186. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, *et al.*: **Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance.** *Cancer* **1996**, 77(2):255-264.
187. Watson AJ, Merritt AJ, Jones LS, *et al.*: **Evidence of reciprocity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas.** *Br J Cancer* **1996**, 73(8):889-895.
188. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, *et al.*: **bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis.** *Cancer Res* **1995**, 55(2):237-241.
189. Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, *et al.*: **Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum.** *Clin Cancer Res* **1996**, 2(12):1999-2006.
190. Paradiso A, Simone G, Lena MD, *et al.*: **Expression of apoptosis-related markers and clinical outcome in patients with advanced colorectal cancer.** *Br J Cancer* **2001**, 84(5):651-658.
191. Langlois NE, Lamb J, Eremin O, *et al.*: **Apoptosis in colorectal carcinoma occurring in patients aged 45 years and under: relationship to prognosis, mitosis, and immunohistochemical demonstration of p53, c-myc and bcl-2 protein products.** *J Pathol* **1997**, 182(4):392-397.
192. Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, *et al.*: **Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas.** *Cancer Res* **1996**, 56(10):2422-2427.
193. Valentini AM, Caruso ML, Armentano R, *et al.*: **Programmed cell death in colorectal carcinogenesis.** *Anticancer Res* **1999**, 19(4B):3019-3024.
194. Hao X, Du M, Bishop AE, *et al.*: **Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma.** *Virchows Arch* **1998**, 433(6):523-527.
195. Schneider HJ, Sampson SA, Cunningham D, *et al.*: **Bcl-2 expression and response to chemotherapy in colorectal adenocarcinomas.** *Br J Cancer* **1997**, 75(3):427-431.
196. Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, *et al.*: **bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer.** *Histopathology* **1999**, 35(4):360-367.
197. Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, *et al.*: **Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2.** *Int J Cancer* **1999**, 84(6):545-552.

198. Manne U, Myers RB, Moron C, *et al.*: **Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma.** *Int J Cancer* **1997**, 74(3):346-358.
199. Manne U, Weiss HL, Grizzle WE: **Bcl-2 expression is associated with improved prognosis in patients with distal colorectal adenocarcinomas.** *Int J Cancer* **2000**, 89(5):423-430.
200. Graziano F, Cascinu S: **Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough?** *Ann Oncol* **2003**, 14(7):1026-1038.
201. Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, *et al.*: **Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2.** *Cancer Res* **1994**, 54(14):3714-3717.
202. Vairo G, Innes KM, Adams JM: **Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival.** *Oncogene* **1996**, 13(7):1511-1519.
203. Liu LU, Holt PR, Krivosheyev V, *et al.*: **Human right and left colon differ in epithelial cell apoptosis and in expression of Bak, a pro-apoptotic Bcl-2 homologue.** *Gut* **1999**, 45(1):45-50.
204. Harris CC: **Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies.** *J Natl Cancer Inst* **1996**, 88(20):1442-1455.
205. Harris CC: **p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment.** *Environ Health Perspect* **1996**, 104 Suppl 3:435-439.
206. Lane DP: **Cancer. p53, guardian of the genome.** *Nature* **1992**, 358(6381):15-16.
207. Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, *et al.*: **Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53.** *Oncogene* **1999**, 18(53):7706-7717.
208. Pasche B, Mulcahy M, Benson AB, 3rd: **Molecular markers in prognosis of colorectal cancer and prediction of response to treatment.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2002**, 16(2):331-345.
209. Levine AJ: **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell* **1997**, 88(3):323-331.
210. Bell SM, Scott N, Cross D, *et al.*: **Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer.** *Gastroenterology* **1993**, 104(1):57-64.
211. Sigal A, Rotter V: **Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome.** *Cancer Res* **2000**, 60(24):6788-6793.
212. Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, *et al.*: **An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms.** *J Pathol* **1994**, 172(1):5-12.

213. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, *et al.*: **Genetic alterations during colorectal-tumor development.** *N Engl J Med* **1988**, 319(9):525-532.
214. Chung DC: **The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis.** *Gastroenterology* **2000**, 119(3):854-865.
215. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, *et al.*: **The colorectal adenoma-carcinoma sequence.** *Br J Surg* **2002**, 89(7):845-860.
216. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, *et al.*: **p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis.** *Cancer Res* **1990**, 50(23):7717-7722.
217. Kim D WW, Bleday R: **Rectal Carcinoma: Etiology and Evaluation.** In: *Fundamentals of Anorectal Surgery* 2nd Edition edn. Edited by Wexner's BsDa. London: W.B. Saunders Company Ltd.; 1998: 279.
218. Gervaz P, Bucher P, Neyroud-Caspar I, *et al.*: **Proximal location of colon cancer is a risk factor for development of metachronous colorectal cancer: a population-based study.** *Dis Colon Rectum* **2005**, 48(2):227-232.
219. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, *et al.*: **Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer.** *N Engl J Med* **2000**, 342(2):69-77.
220. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: **Microsatellite instability in cancer of the proximal colon.** *Science* **1993**, 260(5109):816-819.
221. Forslund A, Lonnroth C, Andersson M, *et al.*: **Mutations and allelic loss of p53 in primary tumor DNA from potentially cured patients with colorectal carcinoma.** *J Clin Oncol* **2001**, 19(11):2829-2836.
222. Borresen-Dale AL, Lothe RA, Meling GI, *et al.*: **TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival.** *Clin Cancer Res* **1998**, 4(1):203-210.
223. Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, *et al.*: **Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer.** *J Clin Oncol* **2002**, 20(7):1735-1743.
224. Bhatavdekar JM, Patel DD, Chikhlikar PR, *et al.*: **Molecular markers are predictors of recurrence and survival in patients with Dukes B and Dukes C colorectal adenocarcinoma.** *Dis Colon Rectum* **2001**, 44(4):523-533.
225. Soong R, Powell B, Elsaleh H, *et al.*: **Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation.** *Eur J Cancer* **2000**, 36(16):2053-2060.

226. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiompanou E, *et al.*: **Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma.** *Cancer* **1999**, 86(8):1421-1430.
227. Buglioni S, D'Agnano I, Vasselli S, *et al.*: **p53 nuclear accumulation and multiploidy are adverse prognostic factors in surgically resected stage II colorectal cancers independent of fluorouracil-based adjuvant therapy.** *Am J Clin Pathol* **2001**, 116(3):360-368.
228. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, *et al.*: **Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location.** *Dis Colon Rectum* **2001**, 44(3):364-372; discussion 372-363.
229. Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini JP, *et al.*: **p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer.** *Eur J Cancer* **2000**, 36(8):1008-1015.
230. Petersen S, Thames HD, Nieder C, *et al.*: **The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview.** *Dis Colon Rectum* **2001**, 44(3):322-333; discussion 333-324.
231. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, *et al.*: **Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents.** *J Clin Invest* **1999**, 104(3):263-269.
232. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, *et al.*: **p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer.** *Clin Cancer Res* **1997**, 3(10):1685-1690.
233. Brett MC, Pickard M, Green B, *et al.*: **p53 protein overexpression and response to biomodulated 5-fluorouracil chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer.** *Eur J Surg Oncol* **1996**, 22(2):182-185.
234. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, *et al.*: **p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents.** *Cell* **1993**, 74(6):957-967.
235. Jernvall P, Makinen M, Karttunen T, *et al.*: **Conserved region mutations of the p53 gene are concentrated in distal colorectal cancers.** *Int J Cancer* **1997**, 74(1):97-101.
236. Manne U, Weiss HL, Myers RB, *et al.*: **Nuclear accumulation of p53 in colorectal adenocarcinoma: prognostic importance differs with race and location of the tumor.** *Cancer* **1998**, 83(12):2456-2467.
237. Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, *et al.*: **Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer.** *Gastroenterology* **1996**, 111(2):307-317.
238. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, *et al.*: **CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability.** *Gastroenterology* **2002**, 122(5):1376-1387.

239. Herman JG, Umar A, Polyak K, *et al.*: **Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95(12):6870-6875.
240. Shen L, Kondo Y, Hamilton SR, *et al.*: **P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53.** *Gastroenterology* **2003**, 124(3):626-633.
241. Greider CW, Blackburn EH: **Telomeres, telomerase and cancer.** *Sci Am* **1996**, 274(2):92-97.
242. Shay JW, Wright WE: **Hayflick, his limit, and cellular ageing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, 1(1):72-76.
243. Reddel RR: **The role of senescence and immortalization in carcinogenesis.** *Carcinogenesis* **2000**, 21(3):477-484.
244. Wai LK: **Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review.** *MedGenMed* **2004**, 6(3):19.
245. Hao YH, Tan Z: **The generation of long telomere overhangs in human cells: a model and its implication.** *Bioinformatics* **2002**, 18(5):666-671.
246. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP: **Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening.** *Cell* **1997**, 88(5):657-666.
247. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, *et al.*: **Mammalian telomeres end in a large duplex loop.** *Cell* **1999**, 97(4):503-514.
248. Blasco MA: **Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging.** *Eur J Cell Biol* **2003**, 82(9):441-446.
249. Shay JW: **At the end of the millennium, a view of the end.** *Nat Genet* **1999**, 23(4):382-383.
250. Greider CW: **Telomeres do D-loop-T-loop.** *Cell* **1999**, 97(4):419-422.
251. Kim SH, Kaminker P, Campisi J: **TIN2, a new regulator of telomere length in human cells.** *Nat Genet* **1999**, 23(4):405-412.
252. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, *et al.*: **Telomerase and cancer.** *Hum Mol Genet* **2001**, 10(7):677-685.
253. Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, *et al.*: **Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang.** *EMBO Rep* **2000**, 1(3):244-252.
254. Bachand F, Triki I, Autexier C: **Human telomerase RNA-protein interactions.** *Nucleic Acids Res* **2001**, 29(16):3385-3393.
255. Greider CW: **Telomerase activity, cell proliferation, and cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95(1):90-92.

256. Haber DA: **Telomeres, cancer, and immortality**. *N Engl J Med* **1995**, 332(14):955-956.
257. Belair CD, Yeager TR, Lopez PM, *et al.*: **Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94(25):13677-13682.
258. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, *et al.*: **Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells**. *Science* **1998**, 279(5349):349-352.
259. Cong YS, Wright WE, Shay JW: **Human telomerase and its regulation**. *Microbiol Mol Biol Rev* **2002**, 66(3):407-425, table of contents.
260. Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L: **Molecular biology of aging**. *Cell* **1999**, 96(2):291-302.
261. Wong JM, Collins K: **Telomere maintenance and disease**. *Lancet* **2003**, 362(9388):983-988.
262. Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, *et al.*: **Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism**. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99(20):12606-12611.
263. Wright WE, Shay JW: **Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology**. *Nat Med* **2000**, 6(8):849-851.
264. Chan SW, Blackburn EH: **New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin**. *Oncogene* **2002**, 21(4):553-563.
265. Herbert B, Pitts AE, Baker SI, *et al.*: **Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death**. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96(25):14276-14281.
266. Halvorsen TL, Leibowitz G, Levine F: **Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis**. *Mol Cell Biol* **1999**, 19(3):1864-1870.
267. Grobelny JV, Kulp-McEliece M, Broccoli D: **Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway**. *Hum Mol Genet* **2001**, 10(18):1953-1961.
268. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, *et al.*: **Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines**. *Nat Med* **1997**, 3(11):1271-1274.
269. Liu JP: **Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity**. *FASEB J* **1999**, 13(15):2091-2104.
270. Zhang X, Mar V, Zhou W, *et al.*: **Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells**. *Genes Dev* **1999**, 13(18):2388-2399.

271. Hahn WC, Weinberg RA: **Rules for making human tumor cells.** *N Engl J Med* **2002**, 347(20):1593-1603.
272. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, *et al.*: **Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA.** *Cell* **1997**, 91(1):25-34.
273. Harley CB: **Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?** *Mutat Res* **1991**, 256(2-6):271-282.
274. Shammass MA: **Telomeres, lifestyle, cancer, and aging.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2011**, 14(1):28-34.
275. Begus-Nahrmann Y, Hartmann D, Kraus J, *et al.*: **Transient telomere dysfunction induces chromosomal instability and promotes carcinogenesis.** *J Clin Invest* **2012**, 122(6):2283-2288.
276. Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, *et al.*: **Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2008**, 28(7):1379-1384.
277. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, *et al.*: **Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older.** *Lancet* **2003**, 361(9355):393-395.
278. Hayflick L: **[The cellular basis of biological aging (author's transl)].** *Verh Dtsch Ges Pathol* **1975**, 59:52-66.
279. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, *et al.*: **Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women.** *Lancet* **2005**, 366(9486):662-664.
280. Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, *et al.*: **White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**, 23(5):842-846.
281. Song Z, von Figura G, Liu Y, *et al.*: **Lifestyle impacts on the aging-associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood.** *Aging Cell* **2010**, 9(4):607-615.
282. Jiang H, Schiffer E, Song Z, *et al.*: **Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105(32):11299-11304.
283. Aubert G, Lansdorp PM: **Telomeres and aging.** *Physiol Rev* **2008**, 88(2):557-579.
284. Harley CB, Futcher AB, Greider CW: **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature* **1990**, 345(6274):458-460.
285. Nordfjall K, Eliasson M, Stegmayr B, *et al.*: **Telomere length is associated with obesity parameters but with a gender difference.** *Obesity (Silver Spring)* **2008**, 16(12):2682-2689.

286. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, *et al.*: **The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length.** *Arch Intern Med* **2008**, 168(2):154-158.
287. Benetti R, Garcia-Cao M, Blasco MA: **Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres.** *Nat Genet* **2007**, 39(2):243-250.
288. Munoz P, Blanco R, Flores JM, *et al.*: **XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer.** *Nat Genet* **2005**, 37(10):1063-1071.
289. Celli GB, de Lange T: **DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion.** *Nat Cell Biol* **2005**, 7(7):712-718.
290. Steinert S, Shay JW, Wright WE: **Modification of subtelomeric DNA.** *Mol Cell Biol* **2004**, 24(10):4571-4580.
291. Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, *et al.*: **Telomere length and possible link to X chromosome.** *Lancet* **2004**, 363(9408):507-510.
292. Zee RY, Michaud SE, Germer S, *et al.*: **Association of shorter mean telomere length with risk of incident myocardial infarction: a prospective, nested case-control approach.** *Clin Chim Acta* **2009**, 403(1-2):139-141.
293. McGrath M, Wong JY, Michaud D, *et al.*: **Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2007**, 16(4):815-819.
294. van der Harst P, van der Steege G, de Boer RA, *et al.*: **Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* **2007**, 49(13):1459-1464.
295. Valdes AM, Richards JB, Gardner JP, *et al.*: **Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis.** *Osteoporos Int* **2007**, 18(9):1203-1210.
296. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, *et al.*: **Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study.** *Lancet* **2007**, 369(9556):107-114.
297. Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, *et al.*: **Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study.** *Am J Epidemiol* **2007**, 165(1):14-21.
298. Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC, *et al.*: **Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes.** *Diabetes Care* **2006**, 29(2):283-289.
299. Wu X, Amos CI, Zhu Y, *et al.*: **Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor.** *J Natl Cancer Inst* **2003**, 95(16):1211-1218.

300. Greene ER, Huang S, Serhan CN, *et al.*: **Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2011**, 96(1-4):27-36.
301. Wang D, Dubois RN: **Eicosanoids and cancer.** *Nat Rev Cancer* **2010**, 10(3):181-193.
302. Warner TD, Mitchell JA: **Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic.** *FASEB J* **2004**, 18(7):790-804.
303. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, *et al.*: **COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99(21):13926-13931.
304. Snipes JA, Kis B, Shelness GS, *et al.*: **Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat.** *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, 313(2):668-676.
305. Smyth EM, Grosser T, Wang M, *et al.*: **Prostanoids in health and disease.** *J Lipid Res* **2009**, 50 Suppl:S423-428.
306. Wu WK, Sung JJ, Lee CW, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms.** *Cancer Lett* **2010**, 295(1):7-16.
307. Antonarakis ES, Heath EI, Walczak JR, *et al.*: **Phase II, randomized, placebo-controlled trial of neoadjuvant celecoxib in men with clinically localized prostate cancer: evaluation of drug-specific biomarkers.** *J Clin Oncol* **2009**, 27(30):4986-4993.
308. Dragovich T, Burris H, 3rd, Loehrer P, *et al.*: **Gemcitabine plus celecoxib in patients with advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: results of a phase II trial.** *Am J Clin Oncol* **2008**, 31(2):157-162.
309. Papadimitrakopoulou VA, William WN, Jr., Dannenberg AJ, *et al.*: **Pilot randomized phase II study of celecoxib in oral premalignant lesions.** *Clin Cancer Res* **2008**, 14(7):2095-2101.
310. Jakobsen A, Mortensen JP, Bisgaard C, *et al.*: **A COX-2 inhibitor combined with chemoradiation of locally advanced rectal cancer: a phase II trial.** *Int J Colorectal Dis* **2008**, 23(3):251-255.
311. Brabender J, Park J, Metzger R, *et al.*: **Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer.** *Ann Surg* **2002**, 235(3):440-443.
312. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* **2001**, 7(4):861-867.
313. Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, *et al.*: **Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas.** *Clin Cancer Res* **1999**, 5(5):1001-1005.

314. Mutter R, Lu B, Carbone DP, *et al.*: **A phase II study of celecoxib in combination with paclitaxel, carboplatin, and radiotherapy for patients with inoperable stage IIIA/B non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* **2009**, 15(6):2158-2165.
315. Fidler MJ, Argiris A, Patel JD, *et al.*: **The potential predictive value of cyclooxygenase-2 expression and increased risk of gastrointestinal hemorrhage in advanced non-small cell lung cancer patients treated with erlotinib and celecoxib.** *Clin Cancer Res* **2008**, 14(7):2088-2094.
316. Edelman MJ, Watson D, Wang X, *et al.*: **Eicosanoid modulation in advanced lung cancer: cyclooxygenase-2 expression is a positive predictive factor for celecoxib + chemotherapy--Cancer and Leukemia Group B Trial 30203.** *J Clin Oncol* **2008**, 26(6):848-855.
317. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, *et al.*: **Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention.** *N Engl J Med* **2005**, 352(11):1071-1080.
318. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, *et al.*: **Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial.** *N Engl J Med* **2005**, 352(11):1092-1102.
319. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C: **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues.** *J Natl Cancer Inst* **2002**, 94(4):252-266.
320. Yang VW, Shields JM, Hamilton SR, *et al.*: **Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis.** *Cancer Res* **1998**, 58(8):1750-1753.
321. Hubbard WC, Alley MC, Gray GN, *et al.*: **Evidence for prostanoid biosynthesis as a biochemical feature of certain subclasses of non-small cell carcinomas of the lung as determined in established cell lines derived from human lung tumors.** *Cancer Res* **1989**, 49(4):826-832.
322. McLemore TL, Hubbard WC, Litterst CL, *et al.*: **Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients.** *Cancer Res* **1988**, 48(11):3140-3147.
323. Ermert L, Dierkes C, Ermert M: **Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors.** *Clin Cancer Res* **2003**, 9(5):1604-1610.
324. Gilroy DW, Tomlinson A, Willoughby DA: **Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation.** *Eur J Pharmacol* **1998**, 355(2-3):211-217.

325. Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL: **Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats.** *J Pharmacol Exp Ther* **1998**, 285(3):1031-1038.
326. Okahara K, Sun B, Kambayashi J: **Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1998**, 18(12):1922-1926.
327. Schwab JM, Beschorner R, Meyermann R, *et al.*: **Persistent accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury.** *J Neurosurg* **2002**, 96(5):892-899.
328. Hoffmann C: **COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use.** *Curr Med Chem* **2000**, 7(11):1113-1120.
329. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction.** *J Clin Invest* **1994**, 94(6):2504-2510.
330. Asano K, Nakamura H, Lilly CM, *et al.*: **Interferon gamma induces prostaglandin G/H synthase-2 through an autocrine loop via the epidermal growth factor receptor in human bronchial epithelial cells.** *J Clin Invest* **1997**, 99(5):1057-1063.
331. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, *et al.*: **Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines.** *J Biol Chem* **1993**, 268(12):9049-9054.
332. Shemesh M, Gurevich M, Mizrachi D, *et al.*: **Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine uterine veins: LH induction of cyclooxygenase and augmentation of prostaglandin production in bovine uterine veins.** *Endocrinology* **1997**, 138(11):4844-4851.
333. Tamura M, Sebastian S, Gurates B, *et al.*: **Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells.** *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, 87(7):3504-3507.
334. Di Popolo A, Memoli A, Apicella A, *et al.*: **IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells.** *Oncogene* **2000**, 19(48):5517-5524.
335. Jones MK, Wang H, Peskar BM, *et al.*: **Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing.** *Nat Med* **1999**, 5(12):1418-1423.
336. Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC: **Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells.** *J Biol Chem* **2004**, 279(13):12171-12180.

337. Lukiw WJ, Ottlecz A, Lambrou G, *et al.*: **Coordinate activation of HIF-1 and NF-kappaB DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2003**, 44(10):4163-4170.
338. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, *et al.*: **Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors.** *Cancer Res* **2000**, 60(5):1306-1311.
339. Wang D, DuBois RN: **Measurement of eicosanoids in cancer tissues.** *Methods Enzymol* **2007**, 433:27-50.
340. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, *et al.*: **Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas.** *Gastroenterology* **1994**, 107(4):1183-1188.
341. Williams CS, Luongo C, Radhika A, *et al.*: **Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas.** *Gastroenterology* **1996**, 111(4):1134-1140.
342. Wang D, Dubois RN: **The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer.** *Oncogene* **2010**, 29(6):781-788.
343. Gupta RA, Dubois RN: **Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2.** *Nat Rev Cancer* **2001**, 1(1):11-21.
344. Marnett LJ, DuBois RN: **COX-2: a target for colon cancer prevention.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2002**, 42:55-80.
345. Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, *et al.*: **Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice.** *Cancer Res* **2000**, 60(17):4705-4708.
346. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, *et al.*: **APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis.** *Nature* **1992**, 359(6392):235-237.
347. Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, *et al.*: **The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2007**, 82(1-4):147-154.
348. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, *et al.*: **The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis.** *N Engl J Med* **2000**, 342(26):1946-1952.
349. Spagnesi MT, Tonelli F, Dolara P, *et al.*: **Rectal proliferation and polyp occurrence in patients with familial adenomatous polyposis after sulindac treatment.** *Gastroenterology* **1994**, 106(2):362-366.
350. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, *et al.*: **Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis.** *N Engl J Med* **1993**, 328(18):1313-1316.

351. Fujimura T, Ohta T, Oyama K, *et al.*: **Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience.** *World J Gastroenterol* **2006**, 12(9):1336-1345.
352. Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, *et al.*: **Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer.** *Ann Surg Oncol* **2004**, 11(3):328-339.
353. Legan M: **Cyclooxygenase-2, p53 and glucose transporter-1 as predictors of malignancy in the development of gallbladder carcinomas.** *Bosn J Basic Med Sci* **2010**, 10(3):192-196.
354. Rigas B, Goldman IS, Levine L: **Altered eicosanoid levels in human colon cancer.** *J Lab Clin Med* **1993**, 122(5):518-523.
355. Cathcart MC, O'Byrne KJ, Reynolds JV, *et al.*: **COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: novel targets for prevention and intervention.** *Biochim Biophys Acta* **2012**, 1825(1):49-63.
356. Goodner CJ, Walike BC, Koerker DJ, *et al.*: **Insulin, glucagon, and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys.** *Science* **1977**, 195(4274):177-179.
357. Bingley PJ, Matthews DR, Williams AJ, *et al.*: **Loss of regular oscillatory insulin secretion in islet cell antibody positive non-diabetic subjects.** *Diabetologia* **1992**, 35(1):32-38.
358. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI: **Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism.** *Lancet* **2010**, 375(9733):2267-2277.
359. Kido Y, Nakae J, Accili D: **Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets.** *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, 86(3):972-979.
360. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, *et al.*: **Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo.** *J Biol Chem* **2000**, 275(50):38990-38994.
361. Pessin JE, Saltiel AR: **Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance.** *J Clin Invest* **2000**, 106(2):165-169.
362. Del Giudice ME, Fantus IG, Ezzat S, *et al.*: **Insulin and related factors in premenopausal breast cancer risk.** *Breast Cancer Res Treat* **1998**, 47(2):111-120.
363. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, *et al.*: **Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study.** *J Clin Oncol* **2002**, 20(1):42-51.
364. Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A, *et al.*: **Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women.** *J Natl Cancer Inst* **2000**, 92(19):1592-1600.

365. Schoen RE, Tangen CM, Kuller LH, *et al.*: **Increased blood glucose and insulin, body size, and incident colorectal cancer.** *J Natl Cancer Inst* **1999**, 91(13):1147-1154.
366. Koohestani N, Tran TT, Lee W, *et al.*: **Insulin resistance and promotion of aberrant crypt foci in the colons of rats on a high-fat diet.** *Nutr Cancer* **1997**, 29(1):69-76.
367. Watkins LF, Lewis LR, Levine AE: **Characterization of the synergistic effect of insulin and transferrin and the regulation of their receptors on a human colon carcinoma cell line.** *Int J Cancer* **1990**, 45(2):372-375.
368. Moschos SJ, Mantzoros CS: **The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications.** *Oncology (Williston Park)* **2002**, 63(4):317-332.
369. Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL: **Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer.** *J Natl Cancer Inst* **2002**, 94(13):972-980.
370. Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, *et al.*: **Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study.** *J Natl Cancer Inst* **2005**, 97(22):1688-1694.
371. Dal Maso L, Augustin LS, Karalis A, *et al.*: **Circulating adiponectin and endometrial cancer risk.** *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, 89(3):1160-1163.
372. Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, *et al.*: **Adiponectin and breast cancer risk.** *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, 89(3):1102-1107.
373. Petridou E, Mantzoros C, Dessypris N, *et al.*: **Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece.** *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, 88(3):993-997.
374. Masur K, Vetter C, Hinz A, *et al.*: **Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation.** *Br J Cancer* **2011**, 104(2):345-352.
375. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, *et al.*: **New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes.** *Diabetes Care* **2009**, 32(9):1620-1625.
376. Alimova IN, Liu B, Fan Z, *et al.*: **Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro.** *Cell Cycle* **2009**, 8(6):909-915.
377. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, *et al.*: **Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells.** *Cancer Res* **2006**, 66(21):10269-10273.
378. Vykoukal D, Davies MG: **Biology of metabolic syndrome in a vascular patient.** *Vascular* **2012**, 20(3):156-165.

379. Hadaegh F, Mohebi R, Cheraghi L, *et al.*: **Do different metabolic syndrome definitions predict cerebrovascular events and coronary heart disease independent of their components?: 9 years follow-up of the tehran lipid and glucose study.** *Stroke* **2012**, 43(6):1669-1671.
380. Witso E: **The role of infection-associated risk factors in prosthetic surgery.** *Hip Int* **2012**, 22 Suppl 8:S5-8.
381. Jeon CY, Haan MN, Cheng C, *et al.*: **Helicobacter pylori infection is associated with an increased rate of diabetes.** *Diabetes Care* **2012**, 35(3):520-525.
382. Spyridopoulos TN, Dessypris N, Antoniadis AG, *et al.*: **Insulin resistance and risk of renal cell cancer: a case-control study.** *Hormones (Athens)* **2012**, 11(3):308-315.
383. Byers T, Sedjo RL: **Does intentional weight loss reduce cancer risk?** *Diabetes Obes Metab* **2011**, 13(12):1063-1072.
384. Alvino CL, Ong SC, McNeil KA, *et al.*: **Understanding the mechanism of insulin and insulin-like growth factor (IGF) receptor activation by IGF-II.** *PLoS One* **2011**, 6(11):e27488.
385. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G: **FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins.** *Biochim Biophys Acta* **2011**, 1813(11):1938-1945.
386. Tan BX, Yao WX, Ge J, *et al.*: **Prognostic influence of metformin as first-line chemotherapy for advanced nonsmall cell lung cancer in patients with type 2 diabetes.** *Cancer* **2011**, 117(22):5103-5111.
387. Mu N, Zhu Y, Wang Y, *et al.*: **Insulin resistance: a significant risk factor of endometrial cancer.** *Gynecol Oncol* **2012**, 125(3):751-757.
388. Rabiau N, Dechelotte P, Adjakly M, *et al.*: **BRCA1, BRCA2, AR and IGF-I expression in prostate cancer: correlation between RT-qPCR and immunohistochemical detection.** *Oncol Rep* **2011**, 26(3):695-702.
389. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, *et al.*: **Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor.** *Cancer Res* **1994**, 54(20):5474-5478.
390. Koutsilieris M, Frenette G, Lazure C, *et al.*: **Urokinase-type plasminogen activator: a paracrine factor regulating the bioavailability of IGFs in PA-III cell-induced osteoblastic metastases.** *Anticancer Res* **1993**, 13(2):481-486.
391. Brazeau P, Vale W, Burgus R, *et al.*: **Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone.** *Science* **1973**, 179(4068):77-79.
392. Schettini G: **Brain somatostatin: receptor-coupled transducing mechanisms and role in cognitive functions.** *Pharmacol Res* **1991**, 23(3):203-215.

393. Lamberts SW: **The role of somatostatin in the regulation of anterior pituitary hormone secretion and the use of its analogs in the treatment of human pituitary tumors.** *Endocr Rev* **1988**, 9(4):417-436.
394. Lamers CB: **Clinical and pathophysiological aspects of somatostatin and the gastrointestinal tract.** *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* **1987**, 286:19-25.
395. Bousquet C, Puente E, Buscail L, *et al.*: **Antiproliferative effect of somatostatin and analogs.** *Chemotherapy* **2001**, 47 Suppl 2:30-39.
396. Brown M, Rivier J, Vale W: **Somatostatin-28: selective action on the pancreatic beta-cell and brain.** *Endocrinology* **1981**, 108(6):2391-2396.
397. Schally AV, Huang WY, Chang RC, *et al.*: **Isolation and structure of pro-somatostatin: a putative somatostatin precursor from pig hypothalamus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, 77(8):4489-4493.
398. Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, *et al.*: **Octreotide.** *N Engl J Med* **1996**, 334(4):246-254.
399. Patel YC: **Somatostatin and its receptor family.** *Front Neuroendocrinol* **1999**, 20(3):157-198.
400. Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, *et al.*: **All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase.** *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 198(2):605-612.
401. Weckbecker G, Lewis I, Albert R, *et al.*: **Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects.** *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2(12):999-1017.
402. Richardson UI, Schonbrunn A: **Inhibition of adrenocorticotropin secretion by somatostatin in pituitary cells in culture.** *Endocrinology* **1981**, 108(1):281-290.
403. Drouin J, De Lean A, Rainville D, *et al.*: **Characteristics of the interaction between thyrotropin-releasing hormone and somatostatin for thyrotropin and prolactin release.** *Endocrinology* **1976**, 98(2):514-521.
404. Tyrrell JB, Lorenzi M, Gerich JE, *et al.*: **Inhibition by somatostatin of ACTH secretion in Nelson's syndrome.** *J Clin Endocrinol Metab* **1975**, 40(6):1125-1127.
405. Vale W, Rivier C, Brazeau P, *et al.*: **Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin.** *Endocrinology* **1974**, 95(4):968-977.
406. Siler TM, Yen SC, Vale W, *et al.*: **Inhibition by somatostatin on the release of TSH induced in man by thyrotropin-releasing factor.** *J Clin Endocrinol Metab* **1974**, 38(5):742-745.
407. Yen SS, Siler TM, DeVane GW: **Effect of somatostatin in patients with acromegaly: suppression of growth hormone, prolactin, insulin and glucose levels.** *N Engl J Med* **1974**, 290(17):935-938.

408. Boden G, Sivitz MC, Owen OE, *et al.*: **Somatostatin suppresses secretin and pancreatic exocrine secretion.** *Science* **1975**, 190(4210):163-165.
409. Bloom SR, Mortimer CH, Thorner MO, *et al.*: **Inhibition of gastrin and gastric-acid secretion by growth-hormone release-inhibiting hormone.** *Lancet* **1974**, 2(7889):1106-1109.
410. DeVane GW, Siler TM, Yen SS: **Acute suppression of insulin and glucose levels by synthetic somatostatin in normal human subjects.** *J Clin Endocrinol Metab* **1974**, 38(5):913-915.
411. Koerker DJ, Ruch W, Chideckel E, *et al.*: **Somatostatin: hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas.** *Science* **1974**, 184(4135):482-484.
412. Alberti KG, Christensen NJ, Christensen SE, *et al.*: **Inhibition of insulin secretion by somatostatin.** *Lancet* **1973**, 2(7841):1299-1301.
413. Aguilera G, Harwood JP, Catt KJ: **Somatostatin modulates effects of angiotensin II in adrenal glomerulosa zone.** *Nature* **1981**, 292(5820):262-263.
414. Rosenthal J, Escobar-Jimenez F, Raptis S: **Prevention by somatostatin of rise in blood pressure and plasma renin mediated by beta-receptor stimulation.** *Clin Endocrinol (Oxf)* **1977**, 6(6):455-462.
415. Gomez-Pan A, Snow MH, Piercy DA, *et al.*: **Actions of growth hormone-release inhibiting hormone (somatostatin) on the renin aldosterone system.** *J Clin Endocrinol Metab* **1976**, 43(1):240-243.
416. Konturek SJ, Tasler J, Obtulowicz W, *et al.*: **Effect of growth hormone-release inhibiting hormone on hormones stimulating exocrine pancreatic secretion.** *J Clin Invest* **1976**, 58(1):1-6.
417. Gomez-Pan A, Reed JD, Albinus M, *et al.*: **Direct inhibition of gastric acid and pepsin secretion by growth-hormone release-inhibiting hormone in cats.** *Lancet* **1975**, 1(7912):888-890.
418. Raptis S, Dollinger HC, von Berger L, *et al.*: **Effects of somatostatin on gastric secretion and gastrin release in man.** *Digestion* **1975**, 13(1-2):15-26.
419. Nicholl CG, Polak JM, Bloom SR: **The hormonal regulation of food intake, digestion, and absorption.** *Annu Rev Nutr* **1985**, 5:213-239.
420. Ricci GL, Fevery J: **Cholestatic action of somatostatin in the rat: effect on the different fractions of bile secretion.** *Gastroenterology* **1981**, 81(3):552-562.
421. Guillemin R: **Somatostatin inhibits the release of acetylcholine induced electrically in the myenteric plexus.** *Endocrinology* **1976**, 99(6):1653-1654.
422. van Hagen PM, Krenning EP, Kwekkeboom DJ, *et al.*: **Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review.** *Eur J Clin Invest* **1994**, 24(2):91-99.

423. Florio T, Schettini G: **Multiple intracellular effectors modulate physiological functions of the cloned somatostatin receptors.** *J Mol Endocrinol* **1996**, 17(2):89-100.
424. Lee MT, Liebow C, Kamer AR, *et al.*: **Effects of epidermal growth factor and analogues of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues of specific protein substrates in various tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88(5):1656-1660.
425. Tsuzaki S, Moses AC: **Somatostatin inhibits deoxyribonucleic acid synthesis induced by both thyrotropin and insulin-like growth factor-I in FRTL5 cells.** *Endocrinology* **1990**, 126(6):3131-3138.
426. Pan MG, Florio T, Stork PJ: **G protein activation of a hormone-stimulated phosphatase in human tumor cells.** *Science* **1992**, 256(5060):1215-1217.
427. Reardon DB, Wood SL, Brautigam DL, *et al.*: **Activation of a protein tyrosine phosphatase and inactivation of Raf-1 by somatostatin.** *Biochem J* **1996**, 314 (Pt 2):401-404.
428. Florio T, Rim C, Hershberger RE, *et al.*: **The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells.** *Mol Endocrinol* **1994**, 8(10):1289-1297.
429. Buscail L, Delesque N, Esteve JP, *et al.*: **Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91(6):2315-2319.
430. Florio T, Thellung S, Arena S, *et al.*: **Somatostatin and its analog lanreotide inhibit the proliferation of dispersed human non-functioning pituitary adenoma cells in vitro.** *Eur J Endocrinol* **1999**, 141(4):396-408.
431. Albini A, Florio T, Giunciuglio D, *et al.*: **Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis.** *FASEB J* **1999**, 13(6):647-655.
432. Bocci G, Culler MD, Fioravanti A, *et al.*: **In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists.** *Eur J Clin Invest* **2007**, 37(9):700-708.
433. Curtis SB, Hewitt J, Yakubovitz S, *et al.*: **Somatostatin receptor subtype expression and function in human vascular tissue.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2000**, 278(6):H1815-1822.
434. Florio T, Morini M, Villa V, *et al.*: **Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities.** *Endocrinology* **2003**, 144(4):1574-1584.

435. Patel YC, Wheatley T: **In vivo and in vitro plasma disappearance and metabolism of somatostatin-28 and somatostatin-14 in the rat.** *Endocrinology* **1983**, 112(1):220-225.
436. Bauer W, Briner U, Doepfner W, *et al.*: **SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action.** *Life Sci* **1982**, 31(11):1133-1140.
437. Taylor JE, Bogden AE, Moreau JP, *et al.*: **In vitro and in vivo inhibition of human small cell lung carcinoma (NCI-H69) growth by a somatostatin analogue.** *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, 153(1):81-86.
438. Anthony L, Freda PU: **From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue.** *Curr Med Res Opin* **2009**, 25(12):2989-2999.
439. Heron I, Thomas F, Dero M, *et al.*: **Pharmacokinetics and efficacy of a long-acting formulation of the new somatostatin analog BIM 23014 in patients with acromegaly.** *J Clin Endocrinol Metab* **1993**, 76(3):721-727.
440. Beck-Peccoz P, Mariotti S, Guillausseau PJ, *et al.*: **Treatment of hyperthyroidism due to inappropriate secretion of thyrotropin with the somatostatin analog SMS 201-995.** *J Clin Endocrinol Metab* **1989**, 68(1):208-214.
441. Lamberts SW, Uitterlinden P, Verschoor L, *et al.*: **Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995.** *N Engl J Med* **1985**, 313(25):1576-1580.
442. Plewe G, Beyer J, Krause U, *et al.*: **Long-acting and selective suppression of growth hormone secretion by somatostatin analogue SMS 201-995 in acromegaly.** *Lancet* **1984**, 2(8406):782-784.
443. Vezzosi D, Bennet A, Rochaix P, *et al.*: **Octreotide in insulinoma patients: efficacy on hypoglycemia, relationships with Octreoscan scintigraphy and immunostaining with anti-sst2A and anti-sst5 antibodies.** *Eur J Endocrinol* **2005**, 152(5):757-767.
444. Kvols LK, Moertel CG, O'Connell MJ, *et al.*: **Treatment of the malignant carcinoid syndrome. Evaluation of a long-acting somatostatin analogue.** *N Engl J Med* **1986**, 315(11):663-666.
445. Boden G, Ryan IG, Eisenschmid BL, *et al.*: **Treatment of inoperable glucagonoma with the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995.** *N Engl J Med* **1986**, 314(26):1686-1689.
446. Khan S, Krenning EP, van Essen M, *et al.*: **Quality of life in 265 patients with gastroenteropancreatic or bronchial neuroendocrine tumors treated with [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate.** *J Nucl Med* **2011**, 52(9):1361-1368.

447. Wymenga AN, Eriksson B, Salmela PI, *et al.*: **Efficacy and safety of prolonged-release lanreotide in patients with gastrointestinal neuroendocrine tumors and hormone-related symptoms.** *J Clin Oncol* **1999**, 17(4):1111.
448. Faiss S, Rath U, Mansmann U, *et al.*: **Ultra-high-dose lanreotide treatment in patients with metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors.** *Digestion* **1999**, 60(5):469-476.
449. Ruszniewski P, Ducreux M, Chayvialle JA, *et al.*: **Treatment of the carcinoid syndrome with the longacting somatostatin analogue lanreotide: a prospective study in 39 patients.** *Gut* **1996**, 39(2):279-283.
450. Annamalai AK, Webb A, Kandasamy N, *et al.*: **A comprehensive study of clinical, biochemical, radiological, vascular, cardiac, and sleep parameters in an unselected cohort of patients with acromegaly undergoing presurgical somatostatin receptor ligand therapy.** *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, 98(3):1040-1050.
451. Mazziotti G, Giustina A: **Effects of lanreotide SR and Autogel on tumor mass in patients with acromegaly: a systematic review.** *Pituitary* **2010**, 13(1):60-67.
452. Cozzi R, Montini M, Attanasio R, *et al.*: **Primary treatment of acromegaly with octreotide LAR: a long-term (up to nine years) prospective study of its efficacy in the control of disease activity and tumor shrinkage.** *J Clin Endocrinol Metab* **2006**, 91(4):1397-1403.
453. Melmed S, Sternberg R, Cook D, *et al.*: **A critical analysis of pituitary tumor shrinkage during primary medical therapy in acromegaly.** *J Clin Endocrinol Metab* **2005**, 90(7):4405-4410.
454. Bevan JS: **Clinical review: The antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly.** *J Clin Endocrinol Metab* **2005**, 90(3):1856-1863.
455. Amato G, Mazziotti G, Rotondi M, *et al.*: **Long-term effects of lanreotide SR and octreotide LAR on tumour shrinkage and GH hypersecretion in patients with previously untreated acromegaly.** *Clin Endocrinol (Oxf)* **2002**, 56(1):65-71.
456. Colao A, Ferone D, Marzullo P, *et al.*: **Long-term effects of depot long-acting somatostatin analog octreotide on hormone levels and tumor mass in acromegaly.** *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, 86(6):2779-2786.
457. Giustina A, Mazziotti G, Torri V, *et al.*: **Meta-analysis on the effects of octreotide on tumor mass in acromegaly.** *PLoS One* **2012**, 7(5):e36411.
458. Chanson P, Weintraub BD, Harris AG: **Octreotide therapy for thyroid-stimulating hormone-secreting pituitary adenomas. A follow-up of 52 patients.** *Ann Intern Med* **1993**, 119(3):236-240.

459. Blaker M, Schmitz M, Gocht A, *et al.*: **Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas.** *J Hepatol* **2004**, 41(1):112-118.
460. Papotti M, Kumar U, Volante M, *et al.*: **Immunohistochemical detection of somatostatin receptor types 1-5 in medullary carcinoma of the thyroid.** *Clin Endocrinol (Oxf)* **2001**, 54(5):641-649.
461. Halmos G, Sun B, Schally AV, *et al.*: **Human ovarian cancers express somatostatin receptors.** *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, 85(10):3509-3512.
462. Kimura N, Pilichowska M, Date F, *et al.*: **Immunohistochemical expression of somatostatin type 2A receptor in neuroendocrine tumors.** *Clin Cancer Res* **1999**, 5(11):3483-3487.
463. Hofland LJ, Liu Q, Van Koetsveld PM, *et al.*: **Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2A in human somatostatin receptor positive tumors.** *J Clin Endocrinol Metab* **1999**, 84(2):775-780.
464. Schulz S, Schulz S, Schmitt J, *et al.*: **Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies.** *Clin Cancer Res* **1998**, 4(9):2047-2052.
465. Janson ET, Stridsberg M, Gobl A, *et al.*: **Determination of somatostatin receptor subtype 2 in carcinoid tumors by immunohistochemical investigation with somatostatin receptor subtype 2 antibodies.** *Cancer Res* **1998**, 58(11):2375-2378.
466. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, *et al.*: **Somatostatin receptors in human prostate and prostate cancer.** *J Clin Endocrinol Metab* **1995**, 80(9):2806-2814.
467. Parmar H, Bogden A, Mollard M, *et al.*: **Somatostatin and somatostatin analogues in oncology.** *Cancer Treat Rev* **1989**, 16(2):95-115.
468. Hejna M, Schmidinger M, Raderer M: **The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing?** *Ann Oncol* **2002**, 13(5):653-668.
469. Schally AV: **Oncological applications of somatostatin analogues.** *Cancer Res* **1988**, 48(24 Pt 1):6977-6985.
470. Bufill JA: **Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location.** *Ann Intern Med* **1990**, 113(10):779-788.
471. Oh SW, Kim YH, Choi YS, *et al.*: **The comparison of the risk factors and clinical manifestations of proximal and distal colorectal cancer.** *Dis Colon Rectum* **2008**, 51(1):56-61.
472. Papagiorgis P, Oikonomakis I, Karapanagiotou I, *et al.*: **The impact of tumor location on the histopathologic expression of colorectal cancer.** *J Buon* **2006**, 11(3):317-321.

473. Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, *et al.*: **Distinct molecular patterns based on proximal and distal sporadic colorectal cancer: arguments for different mechanisms in the tumorigenesis.** *Int J Colorectal Dis* **2007**, 22(2):115-126.
474. Lindblom A: **Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers.** *Curr Opin Oncol* **2001**, 13(1):63-69.
475. Catalano T, Curia MC, Aceto G, *et al.*: **Mutations in the p53 and Ki-ras genes, microsatellite instability and site of tumor origin in colorectal cancer.** *Oncol Rep* **2005**, 14(3):625-631.
476. Li FY, Lai MD: **Colorectal cancer, one entity or three.** *J Zhejiang Univ Sci B* **2009**, 10(3):219-229.
477. Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L, *et al.*: **Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers.** *Br J Cancer* **2010**, 102(8):1300-1305.
478. Cukusic A, Skrobot Vidacek N, Sopta M, *et al.*: **Telomerase regulation at the crossroads of cell fate.** *Cytogenet Genome Res* **2008**, 122(3-4):263-272.
479. Blackburn EH: **Switching and signaling at the telomere.** *Cell* **2001**, 106(6):661-673.
480. Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL: **Telomeres, telomerase and cancer: an endless search to target the ends.** *Cell Cycle* **2004**, 3(9):1138-1150.
481. Cong YS, Wen J, Bacchetti S: **The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter.** *Hum Mol Genet* **1999**, 8(1):137-142.
482. Nugent CI, Lundblad V: **The telomerase reverse transcriptase: components and regulation.** *Genes Dev* **1998**, 12(8):1073-1085.
483. Wick M, Zubov D, Hagen G: **Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT).** *Gene* **1999**, 232(1):97-106.
484. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, *et al.*: **Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma.** *J Clin Oncol* **2004**, 22(10):1807-1814.
485. Rosenberg R, Gertler R, Stricker D, *et al.*: **Telomere length and hTERT expression in patients with colorectal carcinoma.** *Recent Results Cancer Res* **2003**, 162:177-181.
486. Tahara H, Yasui W, Tahara E, *et al.*: **Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections.** *Oncogene* **1999**, 18(8):1561-1567.

487. Kammori M, Kanauchi H, Nakamura K, *et al.*: **Demonstration of human telomerase reverse transcriptase in human colorectal carcinomas by in situ hybridization.** *Int J Oncol* **2002**, 20(1):15-21.
488. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.*: **Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.** *Science* **1994**, 266(5193):2011-2015.
489. Shay JW, Bacchetti S: **A survey of telomerase activity in human cancer.** *Eur J Cancer* **1997**, 33(5):787-791.
490. de Kok JB, Ruers TJ, van Muijen GN, *et al.*: **Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues.** *Clin Chem* **2000**, 46(3):313-318.
491. Nowak J, Januszkiewicz D, Lewandowski K, *et al.*: **Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2003**, 15(1):75-80.
492. Yasui W, Tahara E, Tahara H, *et al.*: **Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach.** *Jpn J Cancer Res* **1999**, 90(6):589-595.
493. Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, *et al.*: **Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer.** *Int J Mol Med* **2002**, 10(5):589-592.
494. Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, *et al.*: **Expression of telomerase genes correlates with telomerase activity in human colorectal carcinogenesis.** *J Pathol* **2001**, 193(1):21-26.
495. Saleh S, Lam AK, Ho YH: **Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in colorectal cancer.** *Pathology* **2008**, 40(1):25-30.
496. Niiyama H, Mizumoto K, Sato N, *et al.*: **Quantitative analysis of hTERT mRNA expression in colorectal cancer.** *Am J Gastroenterol* **2001**, 96(6):1895-1900.
497. Gonzalo V, Petit A, Castellvi-Bel S, *et al.*: **Telomerase mRNA expression and immunohistochemical detection as a biomarker of malignant transformation in patients with inflammatory bowel disease.** *Gastroenterol Hepatol* **2010**, 33(4):288-296.
498. O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, *et al.*: **Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening.** *Nat Genet* **2002**, 32(2):280-284.
499. Risques RA, Lai LA, Brentnall TA, *et al.*: **Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage.** *Gastroenterology* **2008**, 135(2):410-418.
500. Yoshida R, Kiyozuka Y, Ichiyoshi H, *et al.*: **Change in telomerase activity during human colorectal carcinogenesis.** *Anticancer Res* **1999**, 19(3B):2167-2172.

501. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, *et al.*: **Prognostic potential of the telomerase subunit human telomerase reverse transcriptase in tumor tissue and nontumorous mucosa from patients with colorectal carcinoma.** *Cancer* **2002**, 95(10):2103-2111.
502. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, *et al.*: **High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* **2000**, 6(7):2696-2701.
503. O'Sullivan J, Risques RA, Mandelson MT, *et al.*: **Telomere length in the colon declines with age: a relation to colorectal cancer?** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**, 15(3):573-577.
504. **Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.** *Nature* **2012**, 487(7407):330-337.
505. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, *et al.*: **Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans.** *Nat Genet* **2001**, 28(2):155-159.
506. Gervaz P, Bucher P, Morel P: **Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications.** *J Surg Oncol* **2004**, 88(4):261-266.
507. Vousden KH, Lu X: **Live or let die: the cell's response to p53.** *Nat Rev Cancer* **2002**, 2(8):594-604.
508. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, *et al.*: **Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene.** *Cancer Res* **1994**, 54(12):3131-3135.
509. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, *et al.*: **Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription.** *Clin Cancer Res* **2000**, 6(4):1239-1247.
510. Kusumoto M, Ogawa T, Mizumoto K, *et al.*: **Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells.** *Clin Cancer Res* **1999**, 5(8):2140-2147.
511. Xu D, Wang Q, Gruber A, *et al.*: **Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells.** *Oncogene* **2000**, 19(45):5123-5133.
512. Stampfer MR, Garbe J, Nijjar T, *et al.*: **Loss of p53 function accelerates acquisition of telomerase activity in indefinite lifespan human mammary epithelial cell lines.** *Oncogene* **2003**, 22(34):5238-5251.
513. Beliveau A, Yaswen P: **Soothing the watchman: telomerase reduces the p53-dependent cellular stress response.** *Cell Cycle* **2007**, 6(11):1284-1287.
514. Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, *et al.*: **Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73.** *Oncogene* **2006**, 25(6):813-826.

515. Jin X, Beck S, Sohn YW, *et al.*: **Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor.** *Exp Mol Med* **2010**, 42(8):574-582.
516. Rahman R, Latonen L, Wiman KG: **hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity.** *Oncogene* **2005**, 24(8):1320-1327.
517. Cao Y, Li H, Deb S, *et al.*: **TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity.** *Oncogene* **2002**, 21(20):3130-3138.
518. Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, *et al.*: **Regulation of telomerase and its hTERT messenger in colorectal cancer.** *Oncol Rep* **2004**, 11(2):395-400.
519. Pantic M, Zimmermann S, El Daly H, *et al.*: **Telomere dysfunction and loss of p53 cooperate in defective mitotic segregation of chromosomes in cancer cells.** *Oncogene* **2006**, 25(32):4413-4420.
520. Risques RA, Lai LA, Himmetoglu C, *et al.*: **Ulcerative colitis-associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation.** *Cancer Res* **2011**, 71(5):1669-1679.
521. Midgley R, Kerr D: **Colorectal cancer.** *Lancet* **1999**, 353(9150):391-399.
522. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, *et al.*: **Aspirin and the risk of colorectal cancer in women.** *N Engl J Med* **1995**, 333(10):609-614.
523. Marnett LJ: **Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer.** *Cancer Res* **1992**, 52(20):5575-5589.
524. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW, Jr.: **Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer.** *N Engl J Med* **1991**, 325(23):1593-1596.
525. Waddell WR, Loughry RW: **Sulindac for polyposis of the colon.** *J Surg Oncol* **1983**, 24(1):83-87.
526. Maihofner C, Tegeder I, Euchenhofer C, *et al.*: **Localization and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord.** *Neuroscience* **2000**, 101(4):1093-1108.
527. Euchenhofer C, Maihofner C, Brune K, *et al.*: **Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat.** *Neurosci Lett* **1998**, 248(1):25-28.
528. Maihofner C, Schlotzer-Schrehardt U, Guhring H, *et al.*: **Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in normal and glaucomatous human eyes.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2001**, 42(11):2616-2624.
529. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM: **Cyclooxygenases 1 and 2.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1998**, 38:97-120.
530. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, *et al.*: **Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2.** *J Clin Invest* **1997**, 99(9):2254-2259.

531. Maihofner C, Charalambous MP, Bhabra U, *et al.*: **Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer.** *Carcinogenesis* **2003**, 24(4):665-671.
532. Half E, Tang XM, Gwyn K, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ.** *Cancer Res* **2002**, 62(6):1676-1681.
533. Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, *et al.*: **Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens.** *Cancer Lett* **1999**, 140(1-2):27-35.
534. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, *et al.*: **Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma.** *Cancer Res* **1997**, 57(7):1276-1280.
535. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, *et al.*: **Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas.** *Cancer Res* **1998**, 58(17):3761-3764.
536. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer.** *Br J Cancer* **2000**, 83(3):324-328.
537. Adegboyega PA, Ololade O, Saada J, *et al.*: **Subepithelial myofibroblasts express cyclooxygenase-2 in colorectal tubular adenomas.** *Clin Cancer Res* **2004**, 10(17):5870-5879.
538. Sonoshita M, Takaku K, Oshima M, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts and endothelial cells of intestinal polyps.** *Cancer Res* **2002**, 62(23):6846-6849.
539. Brown JR, DuBois RN: **COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention.** *J Clin Oncol* **2005**, 23(12):2840-2855.
540. Sheng H, Shao J, Morrow JD, *et al.*: **Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells.** *Cancer Res* **1998**, 58(2):362-366.
541. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, *et al.*: **Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97(21):11280-11285.
542. Husain SS, Szabo IL, Tamawski AS: **NSAID inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action.** *Am J Gastroenterol* **2002**, 97(3):542-553.
543. Zhang X, Morham SG, Langenbach R, *et al.*: **Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts.** *J Exp Med* **1999**, 190(4):451-459.

544. Elder DJ, Halton DE, Playle LC, *et al.*: **The MEK/ERK pathway mediates COX-2-selective NSAID-induced apoptosis and induced COX-2 protein expression in colorectal carcinoma cells.** *Int J Cancer* **2002**, 99(3):323-327.
545. Crew TE, Elder DJ, Paraskeva C: **A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate.** *Carcinogenesis* **2000**, 21(1):69-77.
546. Sheng H, Shao J, O'Mahony CA, *et al.*: **Transformation of intestinal epithelial cells by chronic TGF-beta1 treatment results in downregulation of the type II TGF-beta receptor and induction of cyclooxygenase-2.** *Oncogene* **1999**, 18(4):855-867.
547. Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ: **Ceramide regulates the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of extracellular signal-regulated kinase/c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways.** *J Biol Chem* **1998**, 273(49):32943-32949.
548. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer.** *Cancer Res* **1999**, 59(5):987-990.
549. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma.** *Cancer Res* **1999**, 59(1):198-204.
550. Hwang D, Scollard D, Byrne J, *et al.*: **Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* **1998**, 90(6):455-460.
551. Flossmann E, Rothwell PM, British Doctors Aspirin T, *et al.*: **Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies.** *Lancet* **2007**, 369(9573):1603-1613.
552. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, *et al.*: **Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas.** *N Engl J Med* **2006**, 355(9):873-884.
553. Arber N, Eagle CJ, Spicak J, *et al.*: **Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps.** *N Engl J Med* **2006**, 355(9):885-895.
554. Peng L, Zhou Y, Wang Y, *et al.*: **Prognostic significance of COX-2 immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis of the literature.** *PLoS One* **2013**, 8(3):e58891.
555. Eschwege P, Ferlicot S, Droupy S, *et al.*: **A histopathologic investigation of PGE(2) pathways as predictors of proliferation and invasion in urothelial carcinomas of the bladder.** *Eur Urol* **2003**, 44(4):435-441.
556. Mahmoud AS, Umair A, Azzeghaiby SN, *et al.*: **Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and histopathological study.** *Asian Pac J Cancer Prev* **2014**, 15(16):6787-6790.

557. Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, *et al.*: **Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93(10):4816-4820.
558. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, *et al.*: **Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer.** *Cancer Res* **1995**, 55(17):3785-3789.
559. Pisano C, Ottaiano A, Tatangelo F, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression is associated with increased size in human sporadic colorectal adenomas.** *Anticancer Res* **2005**, 25(3B):2065-2068.
560. Tatsu K, Hayashi S, Shimada I, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 in sporadic colorectal polyps: immunohistochemical study and its importance in the early stages of colorectal tumorigenesis.** *Pathol Res Pract* **2005**, 201(6):427-433.
561. Arnoletti JP, Upson J, Babb JS, *et al.*: **Differential stromal and epithelial localization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during colorectal tumorigenesis.** *J Exp Clin Cancer Res* **2005**, 24(2):279-287.
562. Ohta T, Takahashi M, Ochiai A: **Increased protein expression of both inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in human colon cancers.** *Cancer Lett* **2006**, 239(2):246-253.
563. Yamashita K, Arimura Y, Shimizu H, *et al.*: **Increased cyclooxygenase-2 expression in large flat colorectal tumors (laterally spreading tumors).** *J Gastroenterol* **2003**, 38(1):69-73.
564. Battu S, Chable-Rabinovitch H, Rigaud M, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 expression in human adenocarcinoma cell line HT29 cl.19A.** *Anticancer Res* **1998**, 18(4A):2397-2403.
565. Charalambous MP, Maihofner C, Bhambra U, *et al.*: **Upregulation of cyclooxygenase-2 is accompanied by increased expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B kinase-alpha in human colorectal cancer epithelial cells.** *Br J Cancer* **2003**, 88(10):1598-1604.
566. Charalambous MP, Lightfoot T, Speirs V, *et al.*: **Expression of COX-2, NF-kappaB-p65, NF-kappaB-p50 and IKKalpha in malignant and adjacent normal human colorectal tissue.** *Br J Cancer* **2009**, 101(1):106-115.
567. Wendum D, Comperat E, Boelle PY, *et al.*: **Cytoplasmic phospholipase A2 alpha overexpression in stromal cells is correlated with angiogenesis in human colorectal cancer.** *Mod Pathol* **2005**, 18(2):212-220.
568. Williams CS, Tsujii M, Reese J, *et al.*: **Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth.** *J Clin Invest* **2000**, 105(11):1589-1594.

569. Lagorce C, Paraf F, Vidaud D, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 is expressed frequently and early in Barrett's oesophagus and associated adenocarcinoma.** *Histopathology* **2003**, 42(5):457-465.
570. Hao X, Bishop AE, Wallace M, *et al.*: **Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis.** *J Pathol* **1999**, 187(3):295-301.
571. Mohseni H, Zaslau S, McFadden D, *et al.*: **COX-2 inhibition demonstrates potent anti-proliferative effects on bladder cancer in vitro.** *J Surg Res* **2004**, 119(2):138-142.
572. Karnes WE, Jr.: **Implications of low COX-2 expression in colorectal neoplasms with defective DNA mismatch repair.** *J Cell Biochem Suppl* **2000**, 34:23-27.
573. Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, *et al.*: **Overexpression of cyclooxygenase-2 protein is less frequent in gastric cancers with microsatellite instability.** *Int J Cancer* **1999**, 84(4):400-403.
574. Karnes WE, Jr., Shattuck-Brandt R, Burgart LJ, *et al.*: **Reduced COX-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair.** *Cancer Res* **1998**, 58(23):5473-5477.
575. Diamantopoulou K, Lazaris A, Mylona E, *et al.*: **Cyclooxygenase-2 protein expression in relation to apoptotic potential and its prognostic significance in bladder urothelial carcinoma.** *Anticancer Res* **2005**, 25(6C):4543-4549.
576. Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, *et al.*: **Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer.** *Gut* **1999**, 45(5):730-732.
577. Baron JA, Sandler RS, Bresalier RS, *et al.*: **A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas.** *Gastroenterology* **2006**, 131(6):1674-1682.
578. Shiff SJ, Rigas B: **The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs).** *J Exp Med* **1999**, 190(4):445-450.
579. DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, *et al.*: **Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors.** *Gastroenterology* **1996**, 110(4):1259-1262.
580. Hahn E, Kraus S, Arber N: **Role of cyclooxygenase-2 in pathogenesis and prevention of colorectal cancer.** *Dig Dis* **2010**, 28(4-5):585-589.
581. Arber N, Levin B: **Chemoprevention of colorectal neoplasia: the potential for personalized medicine.** *Gastroenterology* **2008**, 134(4):1224-1237.
582. Sinicrope FA: **Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer.** *Mol Carcinog* **2006**, 45(6):447-454.
583. Rao CV, Reddy BS: **NSAIDs and chemoprevention.** *Curr Cancer Drug Targets* **2004**, 4(1):29-42.

584. Grover JK, Yadav S, Vats V, *et al.*: **Cyclo-oxygenase 2 inhibitors: emerging roles in the gut.** *Int J Colorectal Dis* **2003**, 18(4):279-291.
585. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS: **Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2.** *N Engl J Med* **2007**, 356(21):2131-2142.
586. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, *et al.*: **Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers.** *J Biol Chem* **2000**, 275(11):7862-7869.
587. Froidevaux S, Eberle AN: **Somatostatin analogs and radiopeptides in cancer therapy.** *Biopolymers* **2002**, 66(3):161-183.
588. Blasco MA: **Telomeres and cancer: a tale with many endings.** *Curr Opin Genet Dev* **2003**, 13(1):70-76.
589. Chen CH, Chen RJ: **Prevalence of telomerase activity in human cancer.** *J Formos Med Assoc* **2011**, 110(5):275-289.
590. Lam AK, Saleh S, Smith RA, *et al.*: **Quantitative analysis of survivin in colorectal adenocarcinoma: increased expression and correlation with telomerase activity.** *Hum Pathol* **2008**, 39(8):1229-1233.
591. Vidaurreta M, Maestro ML, Rafael S, *et al.*: **Telomerase activity in colorectal cancer, prognostic factor and implications in the microsatellite instability pathway.** *World J Gastroenterol* **2007**, 13(28):3868-3872.
592. Tamakawa RA, Fleisig HB, Wong JM: **Telomerase inhibition potentiates the effects of genotoxic agents in breast and colorectal cancer cells in a cell cycle-specific manner.** *Cancer Res* **2010**, 70(21):8684-8694.
593. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods* **1983**, 65(1-2):55-63.
594. Ejleskar K, Abel F, Sjoberg R, *et al.*: **Fine mapping of the human preprocortistatin gene (CORT) to neuroblastoma consensus deletion region 1p36.3-->p36.2, but absence of mutations in primary tumors.** *Cytogenet Cell Genet* **2000**, 89(1-2):62-66.
595. Robas N, Mead E, Fidock M: **MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion.** *J Biol Chem* **2003**, 278(45):44400-44404.
596. Talme T, Ivanoff J, Hagglund M, *et al.*: **Somatostatin receptor (SSTR) expression and function in normal and leukaemic T-cells. Evidence for selective effects on adhesion to extracellular matrix components via SSTR2 and/or 3.** *Clin Exp Immunol* **2001**, 125(1):71-79.
597. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, *et al.*: **Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A).** *J Biol Chem* **2001**, 276(17):14027-14036.

598. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, *et al.*: **Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization.** *J Biol Chem* **2002**, 277(22):19762-19772.
599. Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, *et al.*: **Molecular signaling of somatostatin receptors.** *Ann N Y Acad Sci* **2004**, 1014:121-131.
600. Annunziata M, Luque RM, Duran-Prado M, *et al.*: **Somatostatin and somatostatin analogues reduce PDGF-induced endometrial cell proliferation and motility.** *Hum Reprod* **2012**, 27(7):2117-2129.
601. Oberg KE: **The management of neuroendocrine tumours: current and future medical therapy options.** *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **2012**, 24(4):282-293.
602. Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ: **Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer.** *Trends Endocrinol Metab* **2002**, 13(10):451-457.
603. Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, *et al.*: **Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation.** *J Physiol Paris* **2000**, 94(3-4):205-210.
604. Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, *et al.*: **The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer.** *Hepatogastroenterology* **2002**, 49(47):1245-1250.
605. Weckbecker G, Raulf F, Stolz B, *et al.*: **Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer.** *Pharmacol Ther* **1993**, 60(2):245-264.
606. Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A, *et al.*: **Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines.** *Urol Oncol* **2002**, 7(3):91-98.
607. Kinova S, Duris I, Kratochvilova E, *et al.*: **Carcinoid tumors--somatostatin in the diagnosis and therapy.** *Bratisl Lek Listy* **2002**, 103(3):108-112.
608. Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC: **The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors.** *Endocr Rev* **1991**, 12(4):450-482.
609. Oda Y, Tanaka Y, Naruse T, *et al.*: **Expression of somatostatin receptor and effects of somatostatin analog on pancreatic endocrine tumors.** *Surg Today* **2002**, 32(8):690-694.
610. Papotti M, Croce S, Bello M, *et al.*: **Expression of somatostatin receptor types 2, 3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumours. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy.** *Virchows Arch* **2001**, 439(6):787-797.
611. Pinzani P, Orlando C, Raggi CC, *et al.*: **Type-2 somatostatin receptor mRNA levels in breast and colon cancer determined by a quantitative RT-PCR assay based on dual label fluorogenic probe and the TaqMan technology.** *Regul Pept* **2001**, 99(2-3):79-86.

612. Scarpignato C, Pelosini I: **Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview.** *Chemotherapy* **2001**, 47 Suppl 2:1-29.
613. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, *et al.*: **Identification and characterization of opioid and somatostatin binding sites in the opossum kidney (OK) cell line and their effect on growth.** *J Cell Biochem* **1996**, 63(4):410-421.
614. Lee JU, Hosotani R, Wada M, *et al.*: **Antiproliferative activity induced by the somatostatin analogue, TT-232, in human pancreatic cancer cells.** *Eur J Cancer* **2002**, 38(11):1526-1534.
615. Zapata PD, Ropero RM, Valencia AM, *et al.*: **Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1.** *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, 87(2):915-926.
616. van Essen M, Sundin A, Krenning EP, *et al.*: **Neuroendocrine tumours: the role of imaging for diagnosis and therapy.** *Nat Rev Endocrinol* **2014**, 10(2):102-114.
617. Xu W, Zhou YF, Xia SH: **Octreotide for primary moderate to severe acute pancreatitis: a meta-analysis.** *Hepatogastroenterology* **2013**, 60(126):1504-1508.
618. Klironomos S, Notas G, Sfakianaki O, *et al.*: **Octreotide modulates the effects on fibrosis of TNF-alpha, TGF-beta and PDGF in activated rat hepatic stellate cells.** *Regul Pept* **2014**, 188:5-12.
619. Tsagarakis NJ, Drygiannakis I, Batistakis AG, *et al.*: **Octreotide induces caspase activation and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells.** *World J Gastroenterol* **2011**, 17(3):313-321.
620. Samonakis DN, Christodoulakis N, Kouroumalis EA: **Octreotide for unresectable hepatocellular carcinoma: beyond the first sight.** *J Clin Gastroenterol* **2006**, 40(1):86-87.
621. Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, *et al.*: **Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors.** *J Hepatol* **2004**, 40(5):792-798.
622. Kouroumalis E, Samonakis D, Skordilis P: **Octreotide treatment of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* **2003**, 37(2):477.
623. Samonakis DN, Moschandreas J, Arnaoutis T, *et al.*: **Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues.** *Oncol Rep* **2002**, 9(4):903-907.
624. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, *et al.*: **Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study.** *Gut* **1998**, 42(3):442-447.

625. Gao S, Yu BP, Li Y, *et al.*: **Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase.** *World J Gastroenterol* **2003**, 9(10):2362-2365.
626. Wang S, Bao Z, Liang QM, *et al.*: **Octreotide stimulates somatostatin receptor-induced apoptosis of SW480 colon cancer cells by activation of glycogen synthase kinase-3beta, A Wnt/beta-catenin pathway modulator.** *Hepatogastroenterology* **2013**, 60(127):1639-1646.
627. Chen JS, Liang QM, Li HS, *et al.*: **Octreotide inhibits growth of colonic cancer SW480 cells by modulating the Wnt/P-catenin pathway.** *Pharmazie* **2009**, 64(2):126-131.
628. Hu C, Yi C, Hao Z, *et al.*: **The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells.** *Cancer Biol Ther* **2004**, 3(8):726-730.
629. Feng RH, Zhu ZG, Li JF, *et al.*: **Inhibition of human telomerase in MKN-45 cell line by antisense hTR expression vector induces cell apoptosis and growth arrest.** *World J Gastroenterol* **2002**, 8(3):436-440.
630. Blackburn EH: **Telomerases.** *Annu Rev Biochem* **1992**, 61:113-129.
631. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, *et al.*: **Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing.** *Nature* **1990**, 346(6287):866-868.
632. Hao ZM, Luo JY, Cheng J, *et al.*: **Design of a ribozyme targeting human telomerase reverse transcriptase and cloning of it's gene.** *World J Gastroenterol* **2003**, 9(1):104-107.
633. Yakoob J, Hu GL, Fan XG, *et al.*: **Telomere, telomerase and digestive cancer.** *World J Gastroenterol* **1999**, 5(4):334-337.
634. Pawlikowski M, Lachowicz L, Kunert-Radek J, *et al.*: **Differential effects of somatostatin and its analog on protein tyrosine kinases activity in the rat pituitary and the murine colonic tumors.** *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, 246(2):375-377.
635. Katic M, Kahn CR: **The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity.** *Cell Mol Life Sci* **2005**, 62(3):320-343.
636. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, *et al.*: **Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer.** *Lancet* **1998**, 351(9113):1393-1396.
637. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, *et al.*: **Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3.** *J Natl Cancer Inst* **1999**, 91(7):620-625.
638. Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, *et al.*: **Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study.** *J Natl Cancer Inst* **1998**, 90(12):911-915.

639. Yu H, Spitz MR, Mistry J, *et al.*: **Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis.** *J Natl Cancer Inst* **1999**, 91(2):151-156.
640. Wetterau LA, Francis MJ, Ma L, *et al.*: **Insulin-like growth factor I stimulates telomerase activity in prostate cancer cells.** *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, 88(7):3354-3359.
641. Baron-Delage S, Capeau J, Barbu V, *et al.*: **Reduced insulin receptor expression and function in human colonic Caco-2 cells by ras and polyoma middle T oncogenes.** *J Biol Chem* **1994**, 269(28):18686-18693.

Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer

Georgios D. Ayiomamitis, MD*[¶]
 George Notas, MD, PhD*[†]
 Apostolos Zaravinos, PhD[‡]
 Adamantia Zizi-Sermpetzoglou,
 MD[§]
 Maria Georgiadou, MD, PhD*
 Ourania Sfakianaki, PhD*
 Elias Kouroumallis, MD, PhD***

From the *Gastroenterology Research Laboratory, [†]Laboratory of Experimental Endocrinology, [‡]Laboratory of Clinical Virology, University of Crete, School of Medicine, Heraklion, Greece, [§]Department of Pathology, [¶]Department of Surgery, Tzanion General Hospital, Zanni & Afentouli str, Piraeus, Greece, and the ***Department of Gastroenterology & Hepatology, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece

Accepted for publication
 Sept. 9, 2013

Correspondence to:

E. Kouroumallis
 University of Crete, Faculty of Medicine
 P.O. Box 1393
 Heraklion, 71409, Crete, Greece
 kouroum@med.uoc.gr

DOI: 10.1503/cjs.031312

Background: Colorectal cancer is one of the most common cancers and the third leading cause of cancer death in both sexes. The disease progresses as a multistep process and is associated with genetic alterations. One of the characteristic features of cancer is telomerase activation. We sought to evaluate the differences in telomerase activity between colon cancer and adjacent normal tissue and to correlate the differences in telomerase activity between different locations with clinicopathological factors and survival.

Methods: Matched colon tumour samples and adjacent normal mucosa samples 10 cm away from the tumour were collected during colectomy. We assessed telomerase activity using real time polymerase chain reaction. Several pathological characteristics of tumours, including p53, Ki-67, p21, bcl2 and MLH1 expression were also studied.

Results: We collected samples from 49 patients. There was a significantly higher telomerase activity in colon cancer tissue than normal tissue. Adenocarcinomas of the right colon express significantly higher telomerase than left-side cancers. Colon cancers and their adjacent normal tissue had significantly more telomerase and were more positive to MLH1 than rectal cancers. The expression of p53 negatively correlated to telomerase activity and was linked to better patient survival.

Conclusion: Colon and rectal cancers seem to have different telomerase and MLH1 profiles, and this could be another factor for their different biologic and clinical behaviour and progression. These results support the idea that the large bowel cannot be considered a uniform organ, at least in the biology of cancer.

Contexte : Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus répandus; il arrive au troisième rang des décès attribuables au cancer chez les hommes et les femmes. La maladie progresse en plusieurs étapes et est associée à des anomalies génétiques. L'une des principales caractéristiques du cancer est l'activation de la télomérase. Nous avons voulu évaluer les différences d'activité de la télomérase entre les tissus touchés par le cancer du côlon et les tissus adjacents normaux afin d'établir une corrélation entre les différences d'activité de la télomérase selon la localisation d'une part et les facteurs clinicopathologiques et la survie d'autre part.

Méthodes : Lors de colectomies, nous avons recueilli des échantillons tissulaires jumelés de tumeur du côlon et de muqueuse adjacente normale à 10 cm du foyer tumoral. Nous avons mesuré l'activité de la télomérase à l'aide de la réaction en chaîne de la polymérase en temps réel. Plusieurs caractéristiques pathologiques des tumeurs ont aussi été analysées, y compris l'expression des gènes p53, Ki-67, p21, bcl2 et MLH1.

Résultats : Nous avons recueilli des échantillons auprès de 49 patients. Nous avons noté une activité nettement plus intense de la télomérase dans les tissus touchés par le cancer du côlon que dans les tissus normaux. Les adénocarcinomes du côlon ascendant expriment une activité de la télomérase significativement plus intense que les cancers du côlon descendant. Les cancers du côlon et les tissus adjacents normaux présentaient une activité significativement plus intense de la télomérase et étaient plus souvent positifs à l'égard du MLH1 comparativement aux cancers rectaux. L'expression du p53 a été en corrélation négative avec l'activité de la télomérase et a été associée à une meilleure survie chez les patients.

Conclusion : Les cancers du côlon et du rectum semblent avoir des profils différents au plan de la télomérase et du gène MLH1. Ce facteur pourrait entre autre expliquer leur comportement et leur progression biologiques et cliniques distincts. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le côlon ne peut être considéré comme un organe uniforme, du moins en ce qui concerne la biologie du cancer.

Cancers of the colon and rectum have been classically viewed as the same disease entity, namely colorectal cancer (CRC), one of the most common cancers in humans and the third leading cause of cancer death. However, more than 2 decades ago, Bufill¹ proposed the existence of 2 distinct categories of CRC according to the location of the tumour in the proximal or distal segments of the colon. Comparison of the risk factors of proximal and distal CRC revealed that type 2 diabetes was associated with distal CRC in men while cholelithiasis was associated with proximal colon cancer in women.² Patients with tumours located within the proximal colon have twice the risk for metachronous CRC than patients with distal initial disease,³ and a higher incidence of advanced disease has been reported.⁴

Moreover, several pathological molecular differences between proximal and distal disease have been demonstrated. The mucinous histotype was more frequent in the proximal than in the distal CRCs.⁵ Two forms of genetic instability have been described in patients with CRC: chromosomal instability (CIN) and microsatellite instability (MSI). However, CIN has been more commonly described in the distal colon than MSI, which is more common with proximal sporadic colon cancers.^{5,6} Mutations in p53 are more frequently associated with distal cancers, whereas K-ras mutations are more frequent in proximal tumours.⁷ These different characteristics may indicate diverse genetic pathways of carcinogenesis and support the hypothesis of distinct mechanisms of neoplastic transformation in the proximal and distal colon, with potential implications in the therapeutic approach. As a consequence, it has been suggested that CRC should be divided into proximal colon cancer, distal colon cancer and rectal cancer.⁸

Malignant transformation during colon cancer development arises as a result of the accumulation of genetic alterations and epigenetic alterations in a multistep process, including the activation of oncogenes, the inactivation of tumour suppressor genes and uncontrolled mitogenic stimulation that transforms colonic epithelial cells to colon adenocarcinoma cells.⁹ Throughout this mutation process, telomerase activation plays a catalytic role in the tumour progression cascade. Human telomeres function as a protective structure capping both ends of the chromosome and act as an intrinsic "counting" mechanism of the aging cellular process. Thus, telomeres limit the capacity of a cell to replicate by inducing senescence as a sort of tumour-suppressing mechanism.¹⁰ Telomerase is an enzymatic ribonucleoprotein complex that acts as a reverse transcriptase and is the main positive regulator of telomere length. Telomerase activity is the most general molecular marker for the identification of human cancer and can be detected in 85%–90% of all tumours.¹¹ Although telomerase activity has been detected in almost 95% of patients with CRC, many discrepancies exist, and telomerase activity between the different anatomic locations of CRC has not been studied adequately.

The aim of this study, therefore, was to evaluate the telomerase activity in colon and rectal cancer tissues and their corresponding adjacent normal mucosal tissues from patients with colorectal adenocarcinoma. We compared telomerase activity in tumours located in different colon locations and analyzed the association between telomerase activity and patient clinicopathological features and survival. We also studied MLH1 as an indicator of MSI, while p53 and other molecular markers were also studied and correlated with telomerase activity.

METHODS

Patients

Between July 2002 and October 2004, we prospectively recruited patients with biopsy-confirmed CRC for participation in this study. The study was approved by our local ethics committee, and we obtained written informed consent from all participants.

At the time of surgery, once the tumour was resected, 4 cancer tissue samples and 4 apparently normal mucosal samples about 10 cm distal to the resection margin were sampled and snap frozen in liquid nitrogen within 10 minutes of resection and then stored at -80°C until studied. The rest of the specimen was sent for standard pathological evaluation. Further analysis on tumour prognostic index markers was completed, and we studied the expression of Ki-67, p21, bcl2 and p53 for all patients.

Patients were followed until April 2011. All patients were referred to the oncology department for standard treatment and follow-up, and no patient received neoadjuvant therapy. We assessed 1-, 3- and 5-year survival and overall survival.

Telomerase activity

We determined telomerase activity using a real-time polymerase chain reaction (rtPCR) assay (Quantitative Telomerase Detection [QTD] kit, US Biomax) according to the manufacturer's instructions. Tissue samples (20 ± 2 mg) were washed with phosphate buffered saline and homogenized with a glass homogenizer in $1 \times$ lysis buffer. After 30 minutes of incubation on ice, the lysates were centrifuged at $12\,000g$ for 30 minutes at 4°C , and the supernatant was rapidly frozen and stored at -80°C . We used part of this extract to determine the total protein concentration with the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories) and bovine serum albumin as a standard. The rest of this extract was diluted with lysis buffer to a concentration of $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$. We used the diluted sample as a template for the rtPCR assay. Measuring the increase in fluorescence caused by the binding of SYBR Green I dye to double-stranded DNA monitored direct detection of the PCR product. The rtPCR master mix comprised $12.5\ \mu\text{L}$ of the QTD premix containing telomere primers, $1\ \mu\text{L}$ of tissue

extract, template controls or heat-inactivated extracts and 11.5 μL of water, for a final volume of 25 μL . After a 20-minute incubation at 25°C, telomere templates were formed by adding 6 base repeats to the primer with the activity of telomerase. The reaction mixture was heated at 90°C for 10 minutes to activate the HotStart DNA polymerase and then subjected to 40 PCR cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. In order to verify specificity and identity of the PCR products, the reaction ended using a melt curve analysis in which the temperature was increased from 55°C to 95°C at a linear rate of 0.2°C/second. Data collection was performed both during annealing and extension, with 2 measurements at each step, and at all times during melt curve analysis. We conducted all PCR experiments on the Mx3000P rtPCR thermal cycler using the software version 2.00 (Stratagene). For estimation of telomerase activity, we used a positive control (TSR template control) to generate a standard curve, consisting of 8 serial dilutions ranging from 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (300 000 molecules/reaction) to 6.4×10^{-6} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The analysis of each sample consisted of 2 assays: one with a sample extract and one with a heat-treated sample extract, which served as a negative control since telomerase is a heat-sensitive enzyme. Control samples were incubated at 85°C for 10 minutes before the telomerase activity assay. To control for mosaicism, all 4 samples were analyzed in 5 patients at the initial phase of the study. Since no significant difference was found among the samples in telomerase activity we continued with the analysis of a single sample (cancer and normal tissue) per patient.

Pathology

For every patient, we selected 1 paraffin block with tumour tissue for the immunohistochemical detection of MLH1, Ki-67, bcl2, p53 and p21 protein expression. We used 4 μm sections from paraffin-embedded tissue blocks of primary tumour specimens. We then performed immunoperoxidase staining in 3 steps using a Dako kit. First, the specimens were dewaxed in xylene and rehydrated with graded alcohols. Endogenous peroxidase was blocked with H_2O_2 0.3% in Tris buffer (pH 7.60) for 15 minutes. Before application of the primary antibody, sections were immersed in 10 mM citrate buffer, rinsed in Tris-buffered saline (TBS) and heated in a microwave oven (650–800 W) for 30 minutes. In order to reduce nonspecific binding of antisera, sections were washed with TBS before application of the primary antibodies: anti-human MutL protein homologue-1, clone E 505 (ready for use, Dako), anti-Ki-67 (MIB-1Ab, dilution 1:80 Dako), anti-p53 (DO-7, dilution 1:100 Biogenex), anti p21 (dilution 1:40 Dako) and anti-bcl2 (dilution 1:10, Biogenex). We used diaminobenzidine as a chromogen followed by slight hematoxylin counterstaining. Tumours with known Ki-67, p53 and p21 status were used as positive controls,

whereas a normal lymph node served the same purpose for bcl2. Preimmune rabbit serum was used as a negative control to test for nonspecific staining.

Two pathologists, blinded to clinical information, independently evaluated immunoreactivity by assessing the percentage of positively immunostained tumour cells. Discrepancies were resolved by consensus. Specifically, MLH1 expression was scored as positive if 10% of cells were found positive. Ki-67 expression was scored as low if less than 20% of cells were found positive, moderate if 20%–50% were positive and high if more than 50% were positive. We classified p53 and p21 expression as negative if less than 5% of cells were positive, low if 5%–30% were positive, moderate if 31%–60% were positive and high if more than 60% were positive. Immunoreactivity for bcl2 was evaluated according to the percentage of tumour cells with positive cytoplasmic staining. We used a cut-off below 5% of positive tumour cells to define negative cases. Strong positive staining was seen in infiltrating lymphocytes within the tumour stroma.

The selection of the cutoff values for each particular marker was based on corresponding categorization from other studies. The chosen thresholds were previously found as best showing prognostic clinicopathological and molecular correlations of the examined markers.^{12–14}

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the IBM SPSS statistics software version 19. Results are expressed as means \pm standard errors of the mean. Paired and unpaired *t* tests or 1-way analysis of variance with Bonferroni post hoc analysis were used where applicable. We performed the χ^2 test for the analysis of nonparametric data in 2×2 tables. Kaplan–Meyer plots were generated based on overall patient survival. We used Pearson and Spearman correlation as applicable for analysis of correlations.

RESULTS

Patients

We included 49 patients (21 women) with a median age of 74 (range 49–87) years with biopsy-confirmed CRC in our study. The demographic, clinical and pathological characteristics of participants are presented in Table 1. Twelve patients were lost during follow-up. For the remaining 37 patients, 1-, 3- and 5-year survival and overall survival were reviewed.

Telomerase activity in tumours compared with normal adjacent tissue

We identified telomerase activity in all tumour samples and in all their adjacent normal mucosa samples. The

mean value of telomerase activity copies was significantly higher in CRC samples than the corresponding adjacent normal tissue ($1.14 \times 10^{-2}/\mu\text{g}$ of protein v. 0.64×10^{-2} , $p = 0.006$; Fig. 1). A total of 83% of the colorectal tumour samples were found to express higher telomerase activity, while only 17% expressed less telomerase activity than matched adjacent mucosa. Interestingly, only 57% of the patients whose tumour samples expressed less telomerase activity than the adjacent mucosa experienced loss of MLH1 expression, whereas 35% of patients whose tumour samples expressed higher telomerase activity had MLH1 loss; however, the numbers were too small to reach statistical significance.

Telomerase activity and clinicopathological features

When we analyzed the associations between clinicopathological factors and expression level of telomerase activity, we found no significant difference in relation to sex, age, smoking history, body mass index and histology grade (Table 2). Interestingly, normal adjacent tissue of Dukes stage A/B tumours had significantly higher telomerase activity than normal adjacent tissue of stage C/D tumours ($p = 0.005$). A similar result was obtained when tumours were analyzed based on the tumour-node-metastasis

(TNM) system, with stage I/II tumours having higher telomerase activity than stage III/IV tumours ($p = 0.029$). Table 2 shows the correlation between telomerase activity expression level and clinicopathological parameters for the patients with CRC. When tumours were classified as right-sided (cecum, ascending colon, transverse colon) and left-sided (splenic flexure, descending colon, sigmoid, rectum), we found that right-sided cancers expressed higher telomerase activity than the left-sided cancers. When tumours were grouped by right colon (cecum, ascending colon, transverse colon), left colon (splenic flexure, descending colon, sigmoid) and rectal cancers, we observed a gradual, significant decrease in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) activity (Fig. 2A), with the rectal tumours having the lowest hTERT activity that was significantly different from the proximal tumours. Finally when tumours were grouped as colon or rectal cancers, we observed a significantly higher level of telomerase activity in colon than rectal tumours ($p = 0.012$). The same increase was evident when normal tissue of patients with colon cancer was compared with normal tissue of those with rectal cancer ($p = 0.035$; Fig. 2B).

We found that p53-negative tumours had higher telomerase activity than p53-positive tumours, but this result showed a trend toward significance (0.0173 ± 0.0058 v. 0.0093 ± 0.0022 telomerase activity copies, $p = 0.06$). Interestingly, p53 expression in the cancer tissue negatively correlated with the telomerase activity in the adjacent normal tissue ($p = 0.003$). Furthermore, colon cancers were p53-positive in 56.3% of patients, while rectal cancers were more commonly positive for p53 (88.2%, $\chi^2 = 5.165$, $p = 0.022$). Typical p53 immunostaining is shown in Fig. 3. There was no correlation between telomerase activity and tumour localization with Ki-67, bcl2 or p21 expression (Table 3).

Table 1. Patient demographic, clinical and pathological characteristics	
Characteristic	No.
Patients	
Cancer tissues	49
Adjacent normal tissues	49
Sex	
Male	28
Female	21
Smoking	
Yes	12
No	34
BMI	
< 25	21
≥ 25	25
Dukes staging system	
B	25
C	19
D	5
Histology grade	
High	4
Medium	41
Low	4
Tumour location	
Right colon	8
Left colon	24
Rectum	17
BMI = body mass index.	

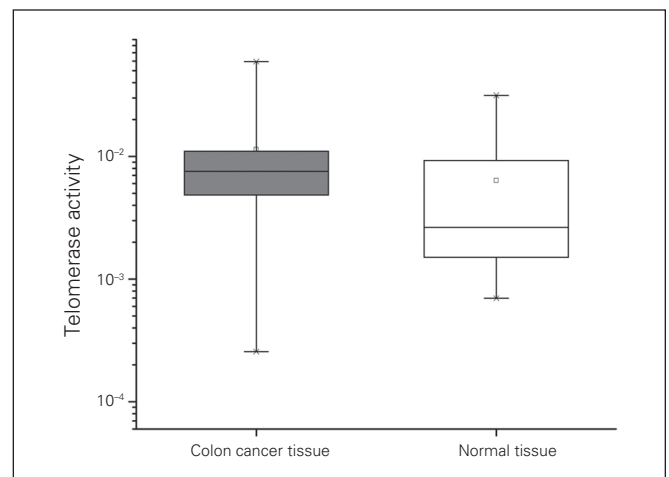


Fig. 1. Telomerase activity in colorectal cancer tissues and corresponding adjacent normal tissues in 49 patients with colon cancer (horizontal line: median; box: mean; □: 1%–99% range).

Microsatellite instability

Eighteen patients experienced loss of MLH1 expression, indicative of MSI. There was no difference in the levels of telomerase activity between MLH1-positive and negative

samples (Table 4). Furthermore there were no significant correlations between MLH1 loss and age, sex and smoking history. Colon cancer samples displayed loss of MLH1 only in 8 of 32 patients (25%), whereas rectal cancer samples indicated loss of MLH1 in 10 of 17 patients

Table 2. Correlation between telomerase activity expression and clinicopathological parameters for patients with colorectal cancer

Variable	Normal mucosa			Cancer tissue		
	No.	Mean \pm SD	<i>p</i> value	No.	Mean \pm SD	<i>p</i> value
Sex			0.52			0.66
Male	28	0.0126 \pm 0.0037		28	0.0055 \pm 0.0014	
Female	21	0.0105 \pm 0.0029		21	0.0070 \pm 0.0019	
Smoke			0.88			0.72
Yes	19	0.0118 \pm 0.0026		19	0.0066 \pm 0.0017	
No	30	0.0126 \pm 0.0060		30	0.0055 \pm 0.0019	
BMI			0.09			0.34
< 25	22	0.0073 \pm 0.0012		22	0.0052 \pm 0.0011	
\geq 25	27	0.0151 \pm 0.0040		27	0.0075 \pm 0.0021	
Dukes stage			0.57			0.011
A	0	—		0	—	
B	25	0.0140 \pm 0.0039		25	0.0104 \pm 0.0023	
C	19	0.0095 \pm 0.0035		19	0.0040 \pm 0.0012	
D	5	0.0098 \pm 0.0010		5	0.0024 \pm 0.0008	
A+B	25	0.0140 \pm 0.0039	0.34	25	0.0103 \pm 0.0024	0.005
C+D	24	0.00096 \pm 0.0028		24	0.0037 \pm 0.0044	
TNM stage						
I	6	0.0027 \pm 0.0009		6	0.0047 \pm 0.0016	
II	19	0.0114 \pm 0.0021		19	0.0155 \pm 0.0035	
III	18	0.0040 \pm 0.0012		18	0.0106 \pm 0.0035	
IV	6	0.0034 \pm 0.0010		6	0.0081 \pm 0.0017	
I-II	25	0.0097 \pm 0.0018	0.029	25	0.0133 \pm 0.0028	0.18
III-IV	24	0.0038 \pm 0.0009		24	0.0099 \pm 0.0026	
Grade			0.89			0.21
Low	4	0.0096 \pm 0.0039		4	0.0123 \pm 0.0045	
Moderate	41	0.0120 \pm 0.0028		41	0.0057 \pm 0.0013	
High	4	0.0088 \pm 0.0018		4	0.0045 \pm 0.0024	
Tumour site			0.09			0.20
Right	8	0.0209 \pm 0.0089		8	0.0101 \pm 0.0036	
Left	7	0.0092 \pm 0.0015		7	0.0081 \pm 0.0032	
Sigmoid	16	0.0133 \pm 0.0040		16	0.0054 \pm 0.0016	
Rectum	18	0.0053 \pm 0.0012		18	0.0034 \pm 0.0012	
Total*	49	0.0114 \pm 0.0023		49	0.0064 \pm 0.0012	
Right colon	15	0.0151 \pm 0.0046	0.09	15	0.0092 \pm 0.0024	0.043
Left colon	34	0.0089 \pm 0.0092		34	0.0043 \pm 0.0010	
Colon	31	0.0144 \pm 0.0032	0.012	31	0.0078 \pm 0.0016	0.035
Rectum	18	0.0053 \pm 0.0012		18	0.0034 \pm 0.0012	
Right colon	8	0.0209 \pm 0.0089	0.047	8	0.0101 \pm 0.0036	0.13
Left colon	23	0.0115 \pm 0.0023		23	0.0066 \pm 0.0016	
Rectum	18	0.0053 \pm 0.0012		18	0.0033 \pm 0.0012	
Ki-67 expression			0.022			0.66
Negative	3	0.0033 \pm 0.0018		—	0.0050 \pm 0.0025	
Positive	46	0.0119 \pm 0.0024		—	0.0065 \pm 0.0013	
p53 expression			0.12			0.037
Negative	16	0.0173 \pm 0.0058		—	0.0103 \pm 0.0033	
Positive	33	0.0093 \pm 0.0022		—	0.0048 \pm 0.0010	

BMI = body mass index; SD = standard deviation; TNM = tumour-node-metastasis.
**p* = 0.006 for cancer versus normal *p* value.

(59%; $p = 0.029$). There was no correlation between MLH1 expression and p53, p21 and bcl2 expression by tumour samples, whereas, surprisingly, there was a correlation between MLH1 expression and expression of high Ki-67 levels.

Correlations with patient survival

In our study group, 1-, 3- and 5-year survival was 85.7%, 65.3% and 55.1%, respectively. There was no correlation between telomerase activity and 1-, 3- or 5-year survival. There was, however, a trend toward a negative correlation between p53 expression and survival, and p53-positive patients tended to survive longer than p53-negative patients (Fig. 4). The p53-positive patients were estimated to live an average of 5.0 (95% confidence interval [CI] 3.7–6.4) years, and p53-negative patients were estimated

to live an average of 3.0 (95% CI 1.1–4.9) years; but we did not consider these results to be significant owing to the small number of patients in each group. There was no correlation between bcl2, p21, Ki-67 and MLH1 expression and patient survival.

DISCUSSION

The aim of this study was to identify the role of telomerase activity levels in the prognosis and localization of CRC and try to identify clinicopathological factors related to its levels. We have demonstrated that telomerase activity is increased in colon cancer tissue compared with adjacent normal tissue and that there are differences between right and left colon cancers. Moreover, there was an inverse association between telomerase and p53 expression. Although telomerase activity did not correlate with patient survival, p53 expression in colon cancer samples was linked to increased patient survival.

Telomeres are TTAGGG tandem repeated sequences of DNA present at the end of chromosomes that are important for ensuring the complete replication of chromosomal ends and for protecting chromosomal termini from fusion and degradation.¹⁵ After a finite number of replications, the telomere reaches a critical length, the senescence checkpoint, and either cell-proliferation arrest or cell apoptosis and death occurs (physiologic aging). However, if the cell escapes or avoids this checkpoint, CIN or end-to-end fusion of the chromosome occurs, which may contribute to cell death or carcinogenesis.¹⁶ Telomere length is normally maintained by an enzyme called telomerase. The telomerase complex consists of hTERT, telomerase associate protein (TP1) and an RNA template for telomeric DNA synthesis (hTR).^{17–19} Human telomerase reverse transcriptase is usually considered to reflect telomerase activity and telomere length. Telomere length and hTERT expression were significantly correlated in normal and cancerous colon tissue.^{20,21} However, telomerase activity does not always correlate with hTERT in colon cancer²² possibly because of the presence of hTERT in infiltrating lymphocytes in normal mucosa. Therefore, the measurement of telomerase within both normal and cancerous bowel epithelial cells.²³

Reports on telomerase activity and expression in non-cancerous tissue seem to be controversial. A number of studies have revealed that telomerase activity is almost absent in normal somatic cells¹⁶ and that it is highly expressed in almost all human tumours but not in adjacent normal cells.^{24,25} On the other hand, other investigators report that telomerase activity is invariably present in all normal human cells and can be considered as a marker of cellular proliferation.^{26–28} Results on the human colon are also conflicting. No hTERT was found in normal mucosa in patients with colon cancer, a result opposite to ours.^{29,30}

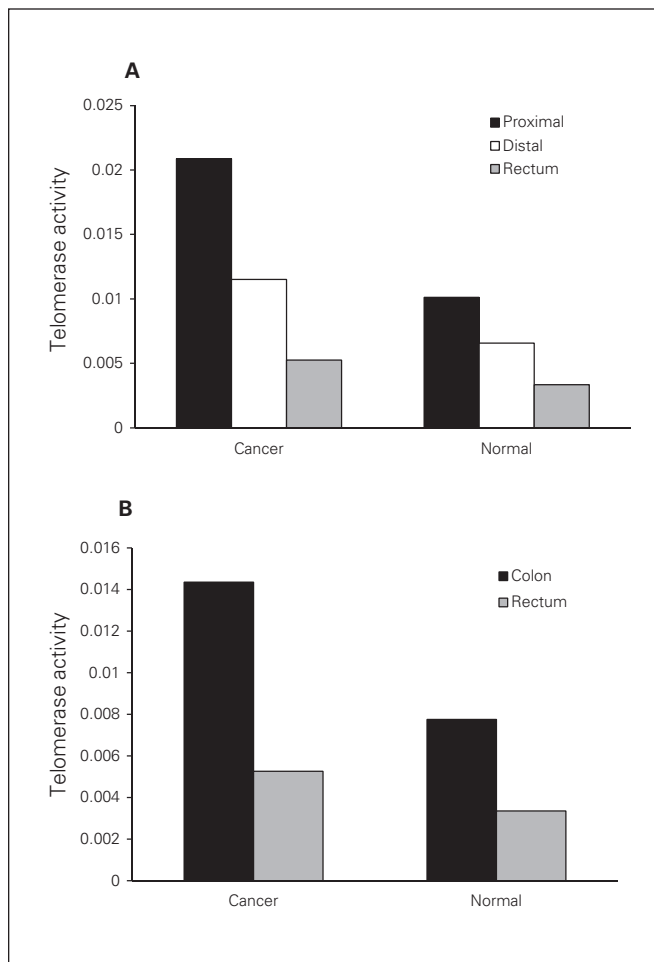


Fig. 2. (A) Telomerase activity between right colon (cecum, ascending colon, transverse colon), left colon (splenic flexure, descending colon, sigmoid) and rectal cancers and their adjacent normal mucosa tissues ($p = 0.006$). **(B)** Comparison of telomerase activity between colon and rectal cancers and their adjacent normal mucosa tissues ($p = 0.012$ for colon v. rectal cancer, and $p = 0.035$ for normal tissue adjacent to colon v. rectal cancer). Results are means \pm standard errors of the mean

In accordance with our study, Nowak and colleagues²⁷ found telomerase activity in normal mucosa taken 5 cm from the tumour, and the levels were higher than those of mucosa taken 10 cm from the tumour. This may be because of the presence of residual cancer cells or tumour-activated normal cells closer to the tumour or to the improvement of the sensitivity of the molecular techniques used for the study of telomerase activity in recent years.

Results of reported studies on telomerase levels in cancerous tissues compared with normal tissues are also controversial. Cancer tissue has been reported to have lower telomerase than the corresponding normal colonic tissue;^{20,21} however, in a series³¹ of 53 patients with colorectal carcinomas and 9 patients with adenomas, patients were reported to have higher levels of hTERT in cancerous than normal tissue. The study reported no difference between cancer and adenomas.³¹ Moreover, in the largest series published so far, hTERT mRNA expression was significantly higher in cancerous tissues than adenomas or normal tissue of 140 patients.³² Further support comes from studies in patients at high risk for CRC because of long-standing inflammatory bowel disease. Overexpression of hTERT in nonaffected colorectal mucosa has been reported in patients with inflammatory bowel disease.^{33,34} Especially in those with ulcerative colitis, hTERT overexpression has been associated with induction of CIN,³⁴ possibly an effect of oxidative damage secondary to inflammation.³⁵ Our results are in accordance with those of most of the aforementioned studies, as we found telomerase activity to be present in all normal colon tissue samples and in colon cancer tissue samples. Unfortunately, we did not have adenoma samples that could further enlighten the differences in telomerase activity and MLH1 expression in the various stages of CRC carcinogenesis.

Recently, Rampazzo and colleagues¹⁰ have studied the association between telomere shortening, genetic instability and site of tumour origin in patients with CRC.¹⁰ They found that telomeres were significantly shorter in CRCs than adjacent normal tissue and that telomere length did not differ with tumour progression or p53 status. Interestingly, the telomere length was different depending on tumour location, with rectal cancers having the longest telomeres, but telomerase expression did not differ with tumour location. Rampazzo and colleagues¹⁰ did not study telomerase activity. Although their results may appear to conflict with ours and could, at least in part, be attributed to differences in the study population, it is possible that the efficiency of telomerase to elongate telomeres is different depending on CRC location. Further studies are needed to identify the reason for this phenomenon, as it could provide interesting new information regarding cancer biology.

An additional controversy arises when telomerase is examined in conjunction with colon cancer stage, pathology and patient survival. We found significantly lower telomerase activity in the normal tissue of patients with Dukes

stage C or D than in those with stage A or B disease. This finding was replicated when patients were classified according to disease stage based on the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system. Although stage C and D colon cancer specimens had lower telomerase activity than stage A and B specimens and AJCC TNM stages III and IV specimens had lower telomerase activity than stage I and II specimens, the result in both cases was not statistically significant. We also found no correlation of telomerase activity with either 3- or 5-year survival. However, others have reported that telomerase activity tended to be higher in the larger, less differentiated late-stage Dukes C and D samples,³⁶ while Union for International Cancer Control stage I tumours showed shorter telomeres and lower telomerase activity than stage IV samples. In another series of studies, hTERT mRNA expression correlated significantly with the

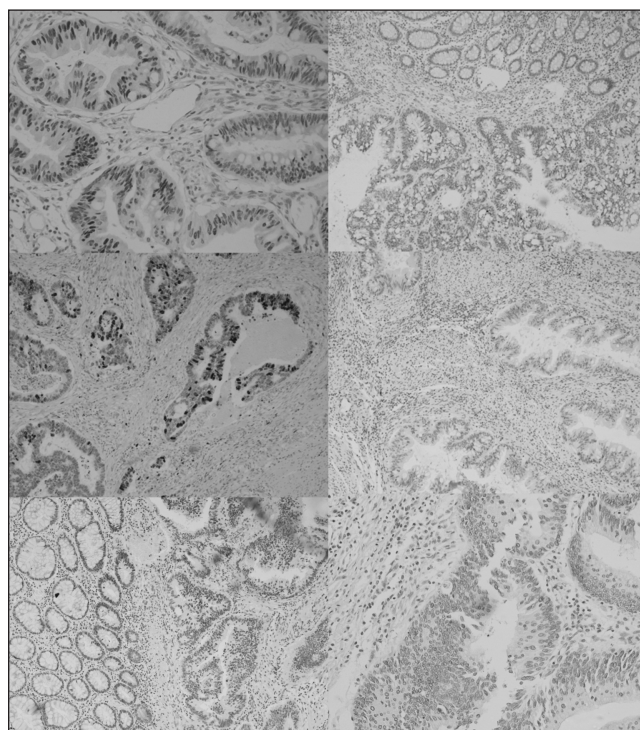


Fig. 3. Colorectal cancer specimens with typical immunostainings. **(Top left)** highly positive nuclear p53 immunoreactivity ($\times 200$) compared with **(top right)** a negative tumour. **(Middle left)** positive nuclear p21 immunoreactivity ($\times 200$) compared with a **(middle right)** a negative sample. **(Bottom left)** positive MLH1 Immunoreactivity ($\times 200$) compared with **(bottom right)** a negative sample.

Table 3. Immunohistochemistry results for p53, bcl2, Ki-67 and p21 in colon and rectal cancer tissues

Marker	Group; positive tissues, no. (%)		p value
	Colon cancer, n = 32	Rectal cancer, n = 17	
p53	18 (56.3)	15 (88.2)	0.023
bcl2	7 (21.9)	6 (35.3)	0.25
Ki-67	29 (90.6)	17 (100)	0.27
p21	17 (53.1)	10 (58.8)	0.47

histological grade, while patients with higher values had poorer survival than patients with lower values.^{20,21,37} Poorer prognosis in patients with high telomerase activity was also reported by others, but there was no correlation with other clinicopathological factors.³⁸ An explanation for these differences may be that in the human bowel, telomere length is inversely related with age until 60–70 years. Beyond this age

telomere length is positively related with age,³⁹ and differences in age between our series and others may account for the discrepancies, although analysis based on age groups did not lead to any useful conclusions (data not shown). Alternatively, our results might imply that in early stages normal epithelium might be more susceptible to new telomerase-driven tumour formation while in late stages the extent of the systemic illness may decrease this potency or that there might be a less powerful regeneration process of the normal colonic epithelium in late stages of colon cancer.

Although several clinical and molecular data support the distinct nature of colon and rectal cancers, CRC is considered a relatively homogeneous disease. However, rectal cancer treatment is differentiated, since radiation therapy is indicated in locally advanced rectal tumours only. From a molecular point of view, there have been studies indicating that tumours located in the proximal colon represent a distinct entity with specific clinical and pathological characteristics.⁸ Although a recent study from the Cancer Genome Atlas Network reported that colon and rectal cancer have considerably similar patterns of genomic alteration, this conclusion was reached after excluding hypermutated cancers (accounting for 16% of their specimens) that included cancers with high MSI, usually with hypermethylation and MLH1 silencing.⁴⁰ Our results, although in some disagreement with the Cancer Genome Atlas Network study, are valuable because they reflect a real life sample from a real world hospital. Furthermore, it has been reported that it is possible that both high telomerase, by conferring cellular immortality, and low telomerase, by promoting CIN, increase the risk of cancer.⁴¹ Our results indicate that high telomerase activity in the colon is associated with the

Table 4. Correlation of MLH1 expression with telomerase activity and clinicopathological features in patients with colon cancer

Factor	MLH1, negative	MLH1, positive	p value
Telomerase activity	0.0125 ± 0.0028	0.0088 ± 0.0039	0.47
Age, yr	71.71	70.28	0.62
Sex			0.45
Male	11	17	
Female	7	11	
Smoke			0.69
Yes	3	9	
No	14	22	
Duke stage			0.048*
A	—	—	
B	13	12	
C	5	14	
D	1	4	
TNM stage			0.019†
I	4	2	
II	9	10	
III	4	14	
IV	1	5	
Tumour site			0.09
Right	1	7	
Left	3	5	
Sigmoid	4	12	
Rectum	10	7	
Proximal	4	12	0.12
Distal	14	19	
Colon	8	24	0.029
Rectum	10	7	
Right	1	7	0.046
Left	7	17	
Rectum	10	7	
p53 expression			0.34
Positive	12	22	
Negative	6	8	
bcl2 expression			0.57
Positive	5	8	
Negative	14	22	
Ki-67 expression			0.033‡
Low	4	3	
Moderate	9	8	
High	5	18	
p21 expression			0.40
Positive	9	17	
Negative	9	14	

TNM = tumour-node-metastasis.
 * χ^2 test for trend $p < 0.05$; the group had fewer than 5 patients.
 † χ^2 test for trend $p < 0.02$; the group had fewer than 5 patients.
 ‡ χ^2 test for trend $p = 0.033$; the group had fewer than 5 patients.

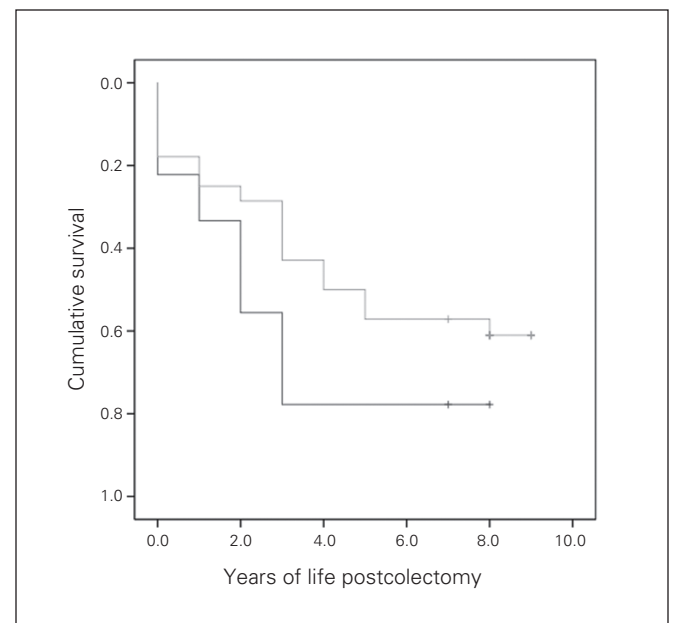


Fig. 4. Kaplan–Meyer plot of survival of patients with p53-positive (grey line) and p53-negative (black line) tumours.

development of cancer, whereas lower telomerase activity in the rectum is associated with increased loss of MLH1 expression signifying increased MSI.

Further molecular differences related to colon cancer localization that have been identified include overexpression of p53 protein mostly in left-sided tumours (43%–60% v. 16%–23% in right-sided tumours).^{10,42} In agreement with these findings, in our series just over half of the colon cancer samples expressed p53, while 88.2% of rectal cancer samples were p53-positive. DNA damage, oncogene activation and hypoxia triggers p53 protein accumulation and transcriptional transactivation of target genes including Bax.⁴³ It also transrepresses the antiapoptotic bcl2 gene.⁴⁴

Several studies have addressed the issue of telomerase/p53 interactions, and it seems that telomerase and p53 counteract each other. Several reports have shown that telomerase activity is inhibited when p53 is overexpressed in human cancer cells.^{45,46} Moreover, the hTERT gene has been shown to be downregulated on activation of wild-type p53.⁴⁷ Inactivation of p53 in human mammary cells led to reactivation of telomerase,⁴⁸ while short dysfunctional or near-dysfunctional telomeres sensitized these cells to p53-dependent signals for growth arrest.⁴⁹ There is also evidence that the p53 family member p73 regulates hTERT, since p73 overexpression downregulates hTERT.⁵⁰ Conversely, hTERT seems to suppress p53-mediated antiapoptotic response by inducing basic fibroblast growth factor.⁵¹ It has also been shown that constitutive hTERT expression inhibits wild-type p53-dependent apoptosis in colon carcinoma cells, and this effect is independent of telomerase activity since a telomerase inactive hTERT mutant was equally effective in antagonizing p53-induced apoptosis.⁵² This finding is consistent with the report that hTERT can promote cell survival independently of its enzymatic activity.⁵³ In a study of 43 patients with CRC, alteration of p53 was found in 44.19% of patients, and mutations of p53 were positively associated with hTERT expression.⁵⁴ Moreover, telomerase suppression (hence short telomeres) and p53 absence have been reported to be associated with abnormalities in chromosomes of colon cancer cells.⁵⁵ In a recent report, patients with ulcerative colitis demonstrated low p53 expression and short telomeres in low-grade dysplasia, while p53 and telomere length were progressively increased in high-grade dysplasia, indicating an inverse association between the 2 in these preneoplastic conditions.⁵⁶ These findings are in agreement with our finding of an inverse association between p53 and hTERT in patients with colon cancer.

Finally, we found that p53 expression was associated with increased patient survival. It is unclear whether there is an association between this finding and telomerase activity, since we found no correlation of telomerase activity levels with patient survival. Further studies are needed to clarify the importance of such an interaction.

CONCLUSION

Our findings further support the concept of multiple molecular entities within the spectrum of CRC. The differences that we and others¹⁰ have identified in telomerase activity in colon and rectal cancers may be related to the diversity of carcinogenesis and disease progression mechanisms in these distinct locations that can be attributed to their discrete embryology, anatomy, physiology and molecular biology. Furthermore, it would be interesting to examine whether p53 expression is in any way related to the response of patients to specific chemotherapeutic agents.

Competing interests: None declared.

Contributors: G.D. Ayiomamitis, G. Notas and E. Kouroumallis designed the study. G.D. Ayiomamitis, A. Zaravinos, A. Zizi-Sermetzoglou, M. Georgiadou and O. Sfakianaki acquired the data, which G. Notas analyzed. G.D. Ayiomamitis and G. Notas wrote the article, which all authors reviewed and approved for publication.

References

1. Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med* 1990;113:779-88.
2. Oh SW, Kim YH, Choi YS, et al. The comparison of the risk factors and clinical manifestations of proximal and distal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2008;51:56-61.
3. Gervaz P, Bucher P, Neyroud-Caspar I, et al. Proximal location of colon cancer is a risk factor for development of metachronous colorectal cancer: a population-based study. *Dis Colon Rectum* 2005;48:227-32.
4. Papagiorgis P, Oikonomakis I, Karapanagiotou I, et al. The impact of tumor location on the histopathologic expression of colorectal cancer. *J BUON* 2006;11:317-21.
5. Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, et al. Distinct molecular patterns based on proximal and distal sporadic colorectal cancer: arguments for different mechanisms in the tumorigenesis. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:115-26.
6. Lindblom A. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol* 2001;13:63-9.
7. Catalano T, Curia MC, Aceto G, et al. Mutations in the p53 and K12 genes, microsatellite instability and site of tumor origin in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005;14:625-31.
8. Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009;10:219-29.
9. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008;135:1079-99.
10. Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L, et al. Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer* 2010;102:1300-5.
11. Cukusic A, Skrobot Vidacek N, Sopta M, et al. Telomerase regulation at the crossroads of cell fate. *Cytogenet Genome Res* 2008;122:263-72.
12. Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, et al. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1735-43.
13. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996;77:255-64.
14. Hilska M, Collan YU, O Laine VJ, et al. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005;48:2197-208.
15. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106:661-73.

16. Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL. Telomeres, telomerase and cancer: an endless search to target the ends. *Cell Cycle* 2004;3:1138-50.
17. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999;8:137-42.
18. Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999;232:97-106.
19. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998;12:1073-85.
20. Rosenberg R, Gertler R, Stricker D, et al. Telomere length and hTERT expression in patients with colorectal carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2003;162:177-81.
21. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:1807-14.
22. Tahara H, Yasui W, Tahara E, et al. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene* 1999;18:1561-7.
23. Kammori M, Kanauchi H, Nakamura K, et al. Demonstration of human telomerase reverse transcriptase in human colorectal carcinomas by in situ hybridization. *Int J Oncol* 2002;20:15-21.
24. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266:2011-5.
25. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-91.
26. de Kok JB, Ruers TJ, van Muijen GN, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clin Chem* 2000;46:313-8.
27. Nowak J, Januszkiewicz D, Lewandowski K, et al. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:75-80.
28. Yasui W, Tahara E, Tahara H, et al. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and pre-cancerous lesions of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:589-95.
29. Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, et al. Expression of telomerase genes correlates with telomerase activity in human colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 2001;193:21-6.
30. Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, et al. Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer. *Int J Mol Med* 2002;10:589-92.
31. Saleh S, Lam AK, Ho YH. Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in colorectal cancer. *Pathology* 2008;40:25-30.
32. Niiyama H, Mizumoto K, Sato N, et al. Quantitative analysis of hTERT mRNA expression in colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1895-900.
33. Gonzalo V, Petit A, Castellvi-Bel S, et al. Telomerase mRNA expression and immunohistochemical detection as a biomarker of malignant transformation in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 2010;33:288-96.
34. O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 2002;32:280-4.
35. Risques RA, Lai LA, Brentnall TA, et al. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology* 2008;135:410-8.
36. Yoshida R, Kiyozuka Y, Ichiyoshi H, et al. Change in telomerase activity during human colorectal carcinogenesis. *Anticancer Res* 1999;19:2167-72.
37. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, et al. Prognostic potential of the telomerase subunit human telomerase reverse transcriptase in tumor tissue and nontumorous mucosa from patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;95:2103-11.
38. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, et al. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2696-701.
39. O'Sullivan J, Risques RA, Mandelson MT, et al. Telomere length in the colon declines with age: A relation to colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:573-7.
40. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487:330-7.
41. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, et al. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* 2001;28:155-9.
42. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons — two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol* 2004;88:261-6.
43. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594-604.
44. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, et al. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994;54:3131-5.
45. Kusumoto M, Ogawa T, Mizumoto K, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:2140-7.
46. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, et al. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 2000;6:1239-47.
47. Xu D, Wang Q, Gruber A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000;19:5123-33.
48. Stampfer MR, Garbe J, Nijjar T, et al. Loss of p53 function accelerates acquisition of telomerase activity in indefinite lifespan human mammary epithelial cell lines. *Oncogene* 2003;22:5238-51.
49. Beliveau A, Yaswen P. Soothing the watchman: telomerase reduces the p53-dependent cellular stress response. *Cell Cycle* 2007;6:1284-7.
50. Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, et al. Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. *Oncogene* 2006;25:813-26.
51. Jin X, Beck S, Sohn YW, et al. Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor. *Exp Mol Med* 2010;42:574-82.
52. Rahman R, Latonen L, Wiman KG. hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene* 2005;24:1320-7.
53. Cao Y, Li H, Deb S, et al. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 2002;21:130-8.
54. Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, et al. Regulation of telomerase and its hTERT messenger in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004;11:395-400.
55. Pantic M, Zimmermann S, El Daly H, et al. Telomere dysfunction and loss of p53 cooperate in defective mitotic segregation of chromosomes in cancer cells. *Oncogene* 2006;25:4413-20.
56. Risques RA, Lai LA, Himmetoglu C, et al. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation. *Cancer Res* 2011;71:1669-79.

Effects of octreotide and insulin on colon cancer cellular proliferation and correlation with hTERT activity.

Georgios D. Ayiomamitis^{1,2}, George Notas^{1,3}, Apostolos Zaravinos^{4,5}, Ioannis Drygiannakis¹, Maria Georgiadou¹, Ourania Sfakianaki¹, Niki Mastrodimou⁶, Kyriaki Thermos⁶, Elias Kouroumallis^{1,7}

¹ Laboratory of Gastroenterology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece.

² 2nd Department of Surgery, Tzaneion General Hospital, Piraeus, Greece.

³ Laboratory of Experimental Endocrinology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece.

⁴ Laboratory of Clinical Virology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece.

⁵ Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

⁶ Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

⁷ Department of Gastroenterology and Hepatology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece.

Correspondence to: Elias Kouroumallis, **email:** kouroum@med.uoc.gr

Keywords: Octreotide, insulin, colorectal cancer, hTERT activity, protein tyrosine phosphatases, sodium orthovanadate.

Received: June 1, 2014

Accepted: June 28, 2014

Published: June 30, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Peptide hormone somatostatin and its receptors have a wide range of physiological functions and play a role in the treatment of numerous human diseases, including colorectal cancer. Octreotide, a synthetic somatostatin-analog peptide, inhibits growth of colonic cancer cells primarily by binding to G-protein coupled receptors and elicits cellular responses through second-messenger systems. Insulin also initiates mitogenic signals in certain cell types. The objective of the present study was to explore the effects of octreotide with or without insulin treatment, on Caco-2 and HT-29 human colon-cancer cell proliferation and to correlate their effects with the activation of telomerase reverse transcriptase (hTERT). The involvement of protein tyrosine phosphatases in the regulation of the anti-proliferative effect of octreotide was also evaluated. Sodium orthovanadate was used to reverse the anti-proliferative effect of octreotide. Telomerase activity was determined for each time point under octreotide and/or insulin treatment. Elevated expression of sst_1 , sst_2 and sst_5 was confirmed in both cell lines by RT-PCR. Immunocytochemistry detected sst_{1f} , sst_{2Af} , sst_{2Bf} , sst_{3f} , sst_4 and sst_5 protein expression in the membranes of both cell lines. Octreotide inhibited the proliferation of Caco-2 and HT-29 cells in a time and dose-dependent manner. Insulin exerted proliferative effects in Caco-2 cells and octreotide reversed its effect in both cell lines. Sodium orthovanadate suppressed the anti-proliferative effect of octreotide both in Caco-2 and HT-29 cells. Telomerase activity was significantly reduced when Caco-2 cells were exposed to octreotide, under serum-free cultured medium. On the other hand, telomerase attenuation after octreotide treatment could not counteract the actions of insulin on both cells. Our data indicate that the use of octreotide could provide a possible therapeutic approach to the management of certain patients who suffer from colon cancer.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is one of the most common malignancies encountered in the western world and the third most common cause of cancer-related mortality. Its increasing incidence and associated morbidity and mortality reflect that colorectal cancer has been the subject of much research with regards to its etiology, diagnosis and treatment. Much has been learnt about the molecular biology of the disease in the last decades, thus paving the way for the possibility of the development of new therapeutic strategies.

Octreotide is an octapeptide that mimics natural somatostatin pharmacologically, though it is a more potent inhibitor of growth hormone, glucagon, and insulin than the natural hormone. Somatostatin was originally described as a natural growth-hormone-release inhibiting factor but it was later proved to have many metabolic and immunological effects through binding to five somatostatin receptors (sst) [1, 2]. These receptors are G-protein coupled receptors and elicit cellular responses through second-messenger systems. These include both “direct” mechanisms and “indirect” mechanisms that might be the result of reduced or inhibited secretion of growth-promoting hormones and growth factors that stimulate the growth of various types of malignancies [3, 4]. Somatostatin and its synthetic analogue, octreotide, are potentially active against colorectal carcinoma due to their anti-proliferative and apoptosis-induced activity. Insulin is a peptide hormone produced by the beta pancreatic cells, and it has also been shown to initiate mitogenic signals in certain cell types, acting as a trophic factor in tumor cells.

Telomerase is a nuclear ribonucleoprotein enzyme complex whose activity may be linked to the processes governing cellular senescence and cellular immortalization [5, 6]. Telomerase activity is typically absent in most normal human cells, but aberrantly expressed in human cancer cells [7]. Colorectal adenocarcinoma has been demonstrated to exhibit high levels of telomerase activity [8-10] and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) was proposed as a potential biomarker for colorectal cancer [9]. Recently, the inhibition of telomerase in actively dividing tumor cells was shown to lead to massive cell death [11]; however the regulatory processes governing the activation of telomerase expression and its level are still areas of active research.

The aim of this study was to evaluate the presence of somatostatin receptors on the colon cancer cell lines Caco-2 and HT-29, and to subsequently study the effects of the somatostatin analogue octreotide on cellular proliferation with or without the trophic effect of insulin. We also investigated the involvement of protein tyrosine phosphatases (PTPs) and telomerase activity in cellular proliferation.

RESULTS

Octreotide suppressed proliferation of colonic epithelial cells

Octreotide, a somatostatin analogue with a longer half life, inhibited the growth of Caco-2 in a dose-dependent way, starting from concentrations as low as 10^{-10} . This effect was more prominent at 96 h than at 48 h of incubation ($p < 0.001$) (Figure 1.A). HT-29 proliferation was also decreased both at 48 h and 96 h in a dose-dependent manner ($p < 0.001$) (Figure 1.B).

Insulin enhanced the proliferation of colonic epithelial cells

On the other hand, insulin significantly enhanced the proliferation of Caco-2 cells in a dose-dependent way ($p < 0.001$) (Figure 1.C). Insulin's proliferative effect on HT-29 cells was noticeable at higher concentrations (10^{-6} M) at 24 h of treatment ($p < 0.001$) (Figure 1.D).

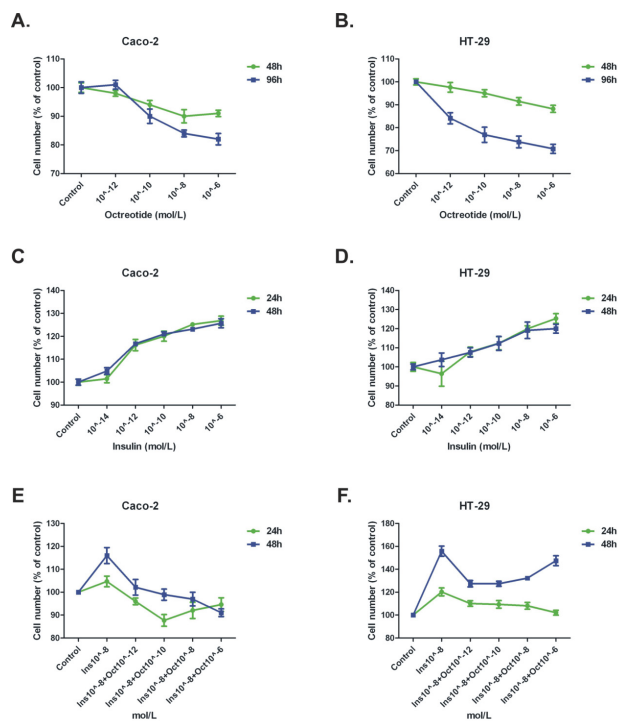


Figure 1: MTT cell proliferation assay on Caco-2 and HT-29 cells. Time-course, octreotide dosing (A-B), insulin dosing (C-D), combination treatment (Insulin and octreotide dosing) (E-F).

Effect of insulin and octreotide co-incubation on colon cancer cells proliferation and PTP inhibition

Octreotide and insulin were then combined at various octreotide concentrations and various time points. We chose insulin concentration (10^{-8} M), for the combination experiments at all time points (24-72 h) because this concentration was previously shown to exhibit best proliferative effects on colonic epithelial cells. Octreotide was capable to reverse the proliferative effect of insulin at all possible concentrations tested, both in 24 h and 48 h of treatment ($p < 0.05$) (Figure 1.E-F). When Na_3VO_4 was used in combination with octreotide in both cell lines, it could reverse the anti-proliferative effect of octreotide in a dose-dependent manner ($p < 0.05$), while alone it didn't show a significant effect on cellular proliferation (Figure 2.A-B).

Expression of somatostatin and its receptors

The expression of somatostatin and its receptors, sst_1 , sst_2 , sst_3 , sst_4 and sst_5 , was investigated at the RNA level in both cell lines. Apart from sst_3 and sst_4 whose

RNA levels were minimal, somatostatin, sst_1 , sst_2 and sst_5 were aberrantly expressed (Figure 3.A-B). The expression of sst_1 , sst_{2A} , sst_{2B} , sst_3 , sst_4 and sst_5 proteins was detected by immunofluorescence in the membranes of both cell lines (Figure 4).

Octreotide's effect on telomerase activity

In order to investigate the pathway that inhibits colonic epithelial-cell proliferation after treatment with octreotide, we studied the activity of telomerase on Caco-2 and HT-29 cells.

The telomerase activity was significantly reduced when serum-free Caco-2 cells were treated with octreotide (10^{-10} - 10^{-6} M, ~ 0.65 -fold, $p < 0.001$) (Figure 5.A). On the contrary, octreotide enhanced telomerase activity in 10% FBS-treated Caco-2 cells after 48h (octreotide 10^{-8} M, 1.35-fold, $p = 0.004$; octreotide 10^{-6} M, 1.47-fold, $p = 0.0027$) (Figure 5.B). Enhancement of telomerase activity was noticed even 6 days post octreotide treatment (10^{-10} M and 10^{-6} M, 1.45-fold, $p = 0.0029$ and $p = 0.0014$). Surprisingly, sodium orthovanadate (10^{-6} M) in combination with 10^{-6} M octreotide did not seem to block octreotide's "enhancing" effect on telomerase (1.38-fold;

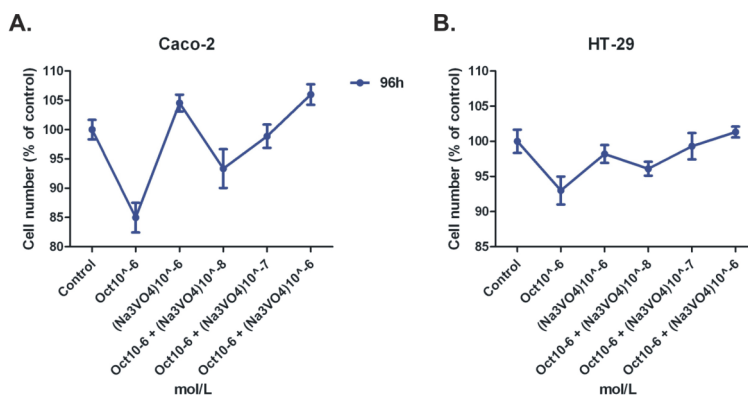


Figure 2: MTT cell proliferation assay on Caco-2 (A) and HT-29 (B) cells. Time point 96h, octreotide and orthovanadate (Na_3VO_4) dosing.

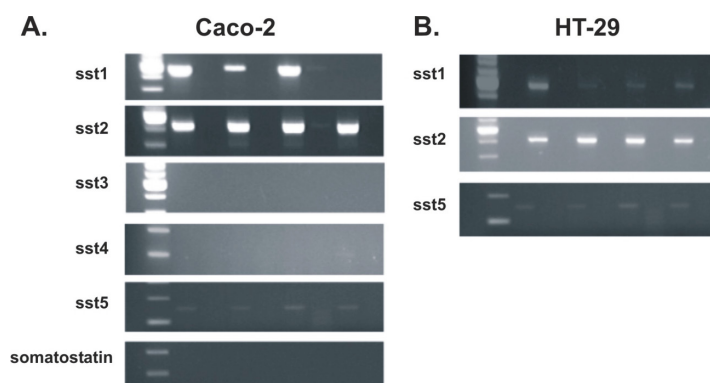


Figure 3: Sst mRNA expression on Caco-2 (A) and HT-29 (B) cells using RT-PCR. Apart from sst_3 and sst_4 whose RNA levels were minimal, somatostatin, sst_1 , sst_2 and sst_5 were aberrantly expressed.

p=0.0042) (Figure 5.C).

Interestingly, octreotide treatment (10^{-10} - 10^{-6} M) significantly enhanced telomerase activity on serum-free HT-29 cells (~1.5-fold, p<0.001) (Figure 5.D). Treatment with octreotide after 48h also enhanced telomerase activity in 10% FBS-treated HT-29 cells (octreotide 10^{-10} M, 1.21-fold, p=0.003; octreotide 10^{-6} M, 1.33-fold, p=0.0025) (Figure 5.E). Treatment with octreotide after 6d also enhanced telomerase activity (10^{-10} - 10^{-6} M, ~1.5-fold, p<0.001). Sodium orthovanadate (10^{-6} M) blocked the effect of octreotide (10^{-6} M) and dramatically reduced telomerase activity (0.86-fold, p=0.0105) (Figure 5.F).

DISCUSSION

Somatostatin (somatotropin release-inhibiting factor - SRIF) and its analogue octreotide, act via six somatostatin receptors, (sst_1 , sst_{2A} , sst_{2B} , sst_{3-5}) who belong to the super-family of transmembrane G-protein coupled receptors and are linked to several signal transduction pathways [2, 12]. While long-acting synthetic somatostatin analogues target the somatostatin receptors (sst), they differ in their binding affinity to these receptors [13]. Somatostatin binds with high affinity to all somatostatin receptors, while octreotide is a preferential sst_2 ligand, which targets the high levels of somatostatin receptor subtype 2 expressed in colon cancers [13]. Octreotide has also moderate affinity to sst_3 and sst_5 [14]. Recent

studies have focused to sst signaling and its effects on cell growth. $Sst_{1,2,4}$ and sst_5 have been shown to cause cell cycle arrest, while sst_3 and less so sst_2 can induce apoptosis [15]. Furthermore $sst_{1,4}$ and sst_5 modulate the MAP kinase pathway and induce G1 cell cycle arrest, while sst_3 and sst_2 promote apoptosis by p53-dependent and independent mechanisms, respectively [16]. It appears that the presence of sst may be important for tumor response to octreotide treatment [17]. Due to its varied actions, somatostatin and its analogs can potentially contribute to cancer diagnosis and treatment through multiple mechanisms.

Compelling evidence has implicated somatostatin in the inhibition of the growth and development of various normal and tumor cells. Thus, somatostatin analogues show anti-neoplastic activity in a variety of experimental models in vivo and in vitro [18, 19]. Over the past decade, impressive anti-neoplastic effects of somatostatin and its analogs have been reported in plenty of tumor models and cancer cell types [20-26]. A similar anti-proliferative effect of SRIF and its analogues has also been reported in numerous in vitro systems [16, 27-29]. SRIF and octreotide are successfully used for the treatment of neuroendocrine tumours and exert anti-proliferative effects on several cell types [30-39].

In the present study, we observed inhibited growth of two colon cancer cell lines (Caco-2 and HT-29), after treatment with octreotide in a time and dose-dependent manner. To our knowledge, this is the first reported description of such an effect. Our results showed that

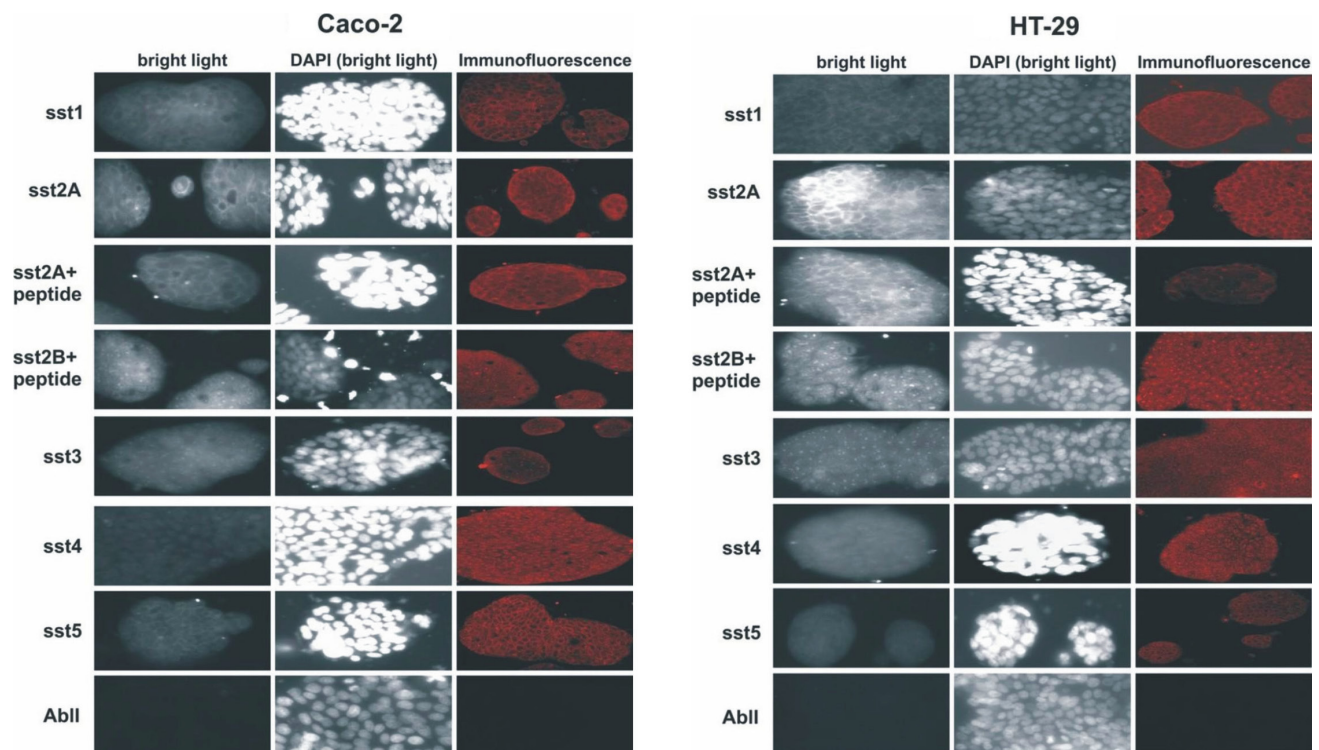


Figure 4: Immunocytochemistry for somatostatin receptors on Caco-2 and HT-29 cells. Expression of sst_1 , sst_{2A} , sst_{2B} , sst_3 , sst_4 and sst_5 proteins was detected by Immunofluorescence in the membranes of both cell lines under confocal microscope.

serum-free Caco-2 cells when treated with octreotide, depressed telomerase activity; whereas in 10% FBS cultured medium, they exert opposite effects by enhancing the activity of telomerase. We also showed that HT-29 cells irrespective the cultured medium, exhibit unexpected enhancement of telomerase activity after treatment with octreotide.

Thus, we speculate that octreotide might inhibit cellular proliferation selectively in the Caco-2 cells by reducing the telomerase activity, whereas on the HT-29 cells, it seems to inhibit cellular proliferation through different molecular pathways. As previously suggested by Gao S. *et al.* [40], one of them might be the AKT/PI3K pathway. Furthermore, Wang et al. [41] showed that octreotide inhibits the growth of colonic cancer SW480 cells through modulation of the Wnt/ β -catenin pathway.

Their findings revealed a negative regulation of the Wnt/ β -catenin pathway by peptide hormone G protein-coupled receptors. The results of Chen et al. [42] also showed that octreotide can inhibit human colonic cancer cell growth through inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway. On the other hand when 10% FBS-treated Caco-2 cells were exposed to octreotide, the activity of telomerase was enhanced. The same effect could also be observed on the 10% FBS-treated HT-29 cells. Thus, when Caco-2 cells are cultured in heat-inactivated 10% FBS medium, it seems that they exert different properties than when cultured in serum-free medium. Interestingly the same could not be observed in HT-29 cells when octreotide treatment enhances telomerase activity, independent of the cultured medium.

Activation of protein tyrosine phosphatases (PTPs)

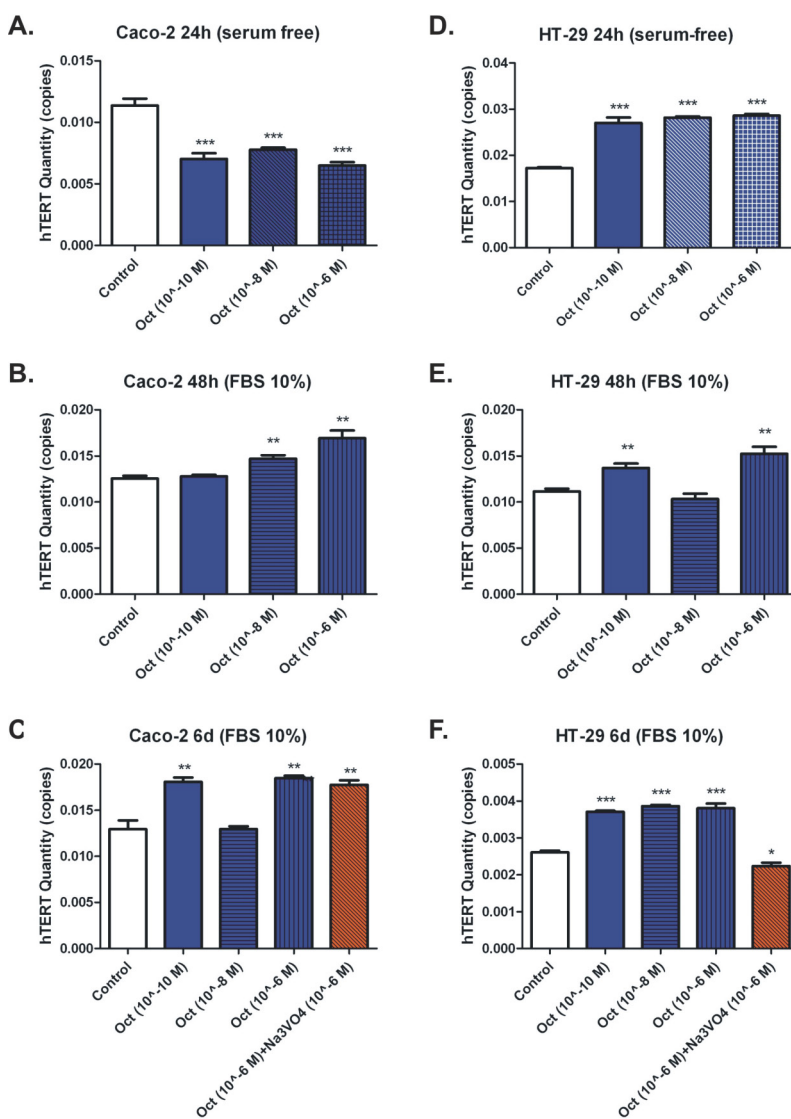


Figure 5: Telomerase activity measurement after octreotide dosing on serum-free (A,D) and 10% FBS treated Caco-2 and HT-29 cells at 24h and 48h respectively (B, C, E and F). Telomerase activity measurement after octreotide dosing and orthovanadate (Na₃VO₄) treatment on 10% FBS treated Caco-2 and HT-29 cells at 6 days (C and F).

Table 1: Primers of the somatostatin receptors sst₁₋₅ and somatostatin that were used for the RT-PCR experiments.

Gene name	Primer sequences
β-Actin	5'-GGTGGCTTTTAGGATGGCAAG-3' 5'-ACTGGAACGGTGAAGGTGACAG-3'
Sst1	5'-CCACCAACATCTACATCCTA-3' 5'-CCACCATCATCACCATTAAG-3'
Sst2	5'-CATCTTCTGCCTGACAGTC-3' 5'-CCACCACAAAGTCAAACAT-3'
Sst3	5'-AGAACGCCCTCTCCTACTGG-3' 5'-GTTGACGATGTTGAGCACG-3'
Sst4	5'-AACCTCGTCGTGACCAG-3' 5'-AGCAGTGCATAGTAGTCCAG-3'
Sst5	5'-GCTTCCAGAAGGTTCTGTGC-3' 5'-TTGCTGGTCTGCATAAGCC-3'
Somatostatin	5'-GTTTCTGCAGAAGTCCCTGG-3' 5'-AATTCTGCAGCCAGCTTTG-3'

is one of the mechanisms via which somatostatin mediates its anti-proliferative effects [16, 27]. In order to investigate whether PTPs are involved in the intracellular pathway regulating the anti-proliferative effect of octreotide on HT-29 and Caco-2 cells, we studied whether the blockade of PTPs could reverse the anti-proliferative effect of octreotide. As expected, the PTP inhibitor sodium orthovanadate, caused a dose-dependent attenuation of the effect of octreotide on both cell lines. Yet, sodium orthovanadate alone did not have any effect on the cellular proliferation of either colon cancer cell lines. It is clearly apparent that the anti-proliferative effect of octreotide on colon cancer cells is mediated by PTPs. Similar results were reported in pancreatic cancer cell lines with the somatostatin analogue TT-232 [13, 29].

However, this might not be the only underlying mechanism. Octreotide inhibition of gastric cancer cells has been reported to be associated with telomerase activity [40]. Therefore we assessed telomerase activity of our cancer cell lines after incubation with octreotide. The results were different in the two cell lines. Octreotide profoundly inhibited telomerase activity in CaCo2 cells but increased activity in the HT-29 cells. In colon cancer, telomerase has been reported to be activated very early in the process of this disease [43], which suggested that activation of telomerase might be also a determining factor contributing to the tumorigenesis. It is not clear from the present study why this discrepancy occurred. Nonetheless, it is a probable explanation why HT-29 are more resistant to the action of octreotide.

Telomerase is an RNA-dependent DNA polymerase comprised of an RNA component [44] that serves as a template; the catalytic subunit, human telomerase reverse transcriptase (hTERT); and a telomerase-associated protein, of unknown function [5]. Telomerase uses its RNA template to catalyze the addition of TTAGGG

repeats to the ends of vertebrate chromosomes [45]. In the absence of telomerase, the telomere will shorten with each successive cell division. This occurs because DNA polymerase α is unable to replicate the very ends of linear DNA, thus leading to the progressive shortening of the telomeric ends in normal somatic cells and appears to be linked to the limited proliferative capacity of normal cells [46]. Telomerase activity has been detected in over 90% of human cancers [44, 47, 48].

In colon cancer, telomerase is activated very early in the process of the disease [49], suggesting that its activation might be also a determining factor that contributes to the process of tumorigenesis. In the present study, we found that the activity of telomerase, measured in hTERT copies, was reduced after octreotide treatment under serum-free cultured Caco-2 colon cancer cells. Surprisingly, we observed opposite effects on the activity of telomerase after octreotide treatment under serum-free cultured HT-29 cells.

Hu et al. (2004) [43] studied the expression of sst3 protein in various cell gastric cell lines. Using immunofluorescence and western blot analysis revealed that sst3 protein were expressed more highly in GES and SGC7901 cells than in AGS cell and no expression was found in MKN45 cell. In our study, Caco-2 and HT-29 cells behaved differently and exhibited different properties on telomerase activity after octreotide treatment. This can be well explained due to possible different protein expression of a sst subtype between these two cell-lines, thus resulting in different telomerase activity in serum-free cultured environments.

On the contrary, after octreotide treatment, telomerase activity was surprisingly enhanced on both Caco-2 and HT-29 cell-lines under 10%FBS cultured medium. The culture medium (in particular, insulin) might play an important role affecting the effect of octreotide. Another explanation might be that octreotide is less active on colon cancer cells. Pawlikowski M *et al.* (1998) [50], studied the differential effects of somatostatin and octreotide on pituitary tyrosin kinase (PTK), and showed that in the case of colonic cancer, the native somatostatin was more effective in inhibiting PTK than octreotide which is active only at the highest concentration studied (10^{-5} M) and surprisingly is much less active in comparison to the native somatostatin. It seems that colonic tumors express less abundantly the octreotide-sensitive subtypes of somatostatine receptors. It is worth to recall that in contrast to octreotide, the native somatostatin binds approximately with the same affinity to all subtypes of sst-receptors [50].

When the PTP inhibitor sodium orthovanadate was applied, it caused attenuation of telomerase activity by completely reversing the action of octreotide under 10% FBS cultured HT-29 cells. However, to our surprise this was not also observed in the Caco-2 cells. This indicates that under certain circumstances, HT-29 and Caco-2 cells

behave differently as far as the telomerase activity is concerned. This observation implies that these two cell lines do not derive from the same organ. Although both of them were isolated from primary colonic tumors, they derive from different patients (Caco-2 cells derive from a female patient of 44 years old; whereas HT-29 cells derive from a male patient of 72 years old) and most probably were isolated from different locations in the colon. There is evidence today that considers colorectum as two or three different organs, due to the different biological profile and properties between different colon locations, rather than as a single unique organ. This might explain the interesting phenomenon of different properties between Caco-2 and HT-29 colon cancer cell lines.

Insulin and the insulin-like growth factors (IGF-1 and IGF-2) represent a family of hormones/growth factors that regulate metabolism, growth, cell differentiation and survival of most tissues in mammals. Insulin and IGF-1 initiate their action via highly homologous signaling systems. The insulin and IGF-1 receptors are members of the tyrosine kinase family of receptors [51]. The mechanisms governing telomerase activation are incompletely understood. Several studies have suggested a link between serum IGF-I levels and risk of several cancers, including prostate, breast, colorectal, and lung carcinoma [52-55]. Lawrence *et al.* (2003) [56], found that IGF-I could potentially contribute to the immortalization process of malignancy by up-regulating telomerase activation, leading to telomere lengthening and extension of the cellular life span on prostate cancer cells [56]. Sophie Baron-Delage *et al.* (1994) [57], showed that insulin has a potent mitogenic effect on Caco-2 cells which is specifically mediated by its own receptors. There is evidence that insulin is able to activate a downstream effector molecule of the mitogenic pathway in this cell type in that it induced a rapid and sustained stimulation of MAP kinase activity [57].

Baring all these in mind we can well explain the results of our study, where Caco-2 and HT-29 cell-lines seem to exert different properties on telomerase activation after octreotide treatment, when cultured in heat-inactivated 10% FBS medium, than when cultured in serum-free medium. The heat-inactivated 10% FBS cultured medium consists of insulin, which has a potent mitogenic/proliferation effect on colon cells. The attenuation of telomerase activity that is observed in serum-free conditions after octreotide treatment, was totally reversed when the cultured medium was changed to heat-inactivated 10% FBS. Surprisingly, then the telomerase activity was enhanced despite the anti-proliferative action of octreotide. It seems that the depression caused by octreotide cannot overcome the mitogenic effect of the cultured medium (i.e. insulin/IGF) on the activity of telomerase in both cell lines.

CONCLUSIONS

We suggest that octreotide acts on cell proliferation mainly via PTP or telomerase signaling and its use could provide an effective therapeutic approach to the management of certain patients suffering from colon. These observations need to be further confirmed.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, reagents and chemicals

The human colon cancer epithelial cell-lines Caco-2 and HT-29 were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Porton Down, UK). Octreotide and insulin were provided by Sandoz Corp. (Wilson, NC) The reagents McCoy's 5A, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, L-glutamine, Modified Eagles Minimum Essential Medium (MEM) and MEM non-essential amino acids, sodium bicarbonate and sodium pyruvate were all purchased from Gibco (Invitrogen, UK). The chemicals 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sodium orthovanadate and dimethyl sulfoxide (DMSO) were provided by Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). A Bio-tek microplate reader (Bio-tek Instruments, Inc, USA) was used for the MTT assays. All plastic-wares were purchased from NUNC (NUNC, Roskilde, Denmark).

Cell culture

Caco-2 and HT-29 cells were cultured at 75 cm² flasks with MEM and McCoy's 5A medium, respectively. Both media were enriched with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM MEM non-essential amino acids, 1.5 g/L sodium bicarbonate and 1.0 mM sodium pyruvate. Cells were maintained in humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. The culture medium change was performed every 3 days.

3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

MTT assays were used to determine cell viability and proliferation, as previously described [58]. In brief, Caco-2 and HT-29 cells were seeded at 2x10⁴ cells/well and 1.5x10⁴ cells/well, respectively, in 24-well plates and incubated in culture medium overnight (day 0). Then Caco-2 and HT-29 cells were made quiescent by serum deprivation and treated with 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰ and 10⁻¹² mol/L of octreotide and/or 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰, 10⁻¹² and 10⁻¹⁴ mol/L of insulin.

¹⁴ mol/L insulin, respectively. Sodium orthovanadate (Na₃VO₄) was also used in various concentrations (10⁻⁶-10⁻⁸ M) in combination with octreotide. Sodium orthovanadate preserves protein phosphorylation by inhibiting endogenous phosphatases that are present in the cell lysate mixture. Sodium orthovanadate was added to prove that the anti-proliferative effect of octreotide on the cells is mediated via the inhibition of endogenous phosphotyrosine phosphatases (PTPs). Caco-2 and HT-29 cells were treated with equal amounts of normal saline, which served as control. After 72 h of incubation, 500 µl of MTT (2.5 mg/ml) was added into each well. After 4 h of incubation, 150 µl DMSO was added to each well. The plate was mixed gently by rocking back and forth until the blue sedimentation crystals were completely dissolved. Finally, 200 µl of each sample was transferred to a 96-well plate and the absorbance was read on a microplate reader at 540 nm with a reference wavelength at 630 nm. Each treatment was performed in triplicate.

Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)

The TRAP in vitro assay was used in order to detect telomerase activity in both cell lines, according to the manufacturer's instructions (Quantitative Telomerase Detection Kit-US Biomax, Inc.). Viable cells were lysed and the telomerase activity in the cell extract was determined through its ability to synthesize telomeric repeats onto an oligonucleotide substrate in vitro upon the addition of the appropriate buffer conditions and dNTPs. Telomerase from the cell extract adds telomeric repeats onto a substrate oligonucleotide and the resultant extended products were subsequently amplified by the qPCR and visualized using SYBR Green dye. All qPCR experiments were conducted on the Mx3000P real-time PCR thermal cycler using the software version 2.00 (Stratagene, La Jolla, CA). For the estimation of telomerase activity, a positive control (TSR template) was used in order to generate a standard curve, which was consisted of eight serial dilutions that ranged from 0.5 µg/µl (3x10⁵ molecules/reaction) to 6.4x10⁻⁶ µg/µl (4 molecules/reaction).

Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from Caco-2 and HT-29 cells using the TRIzol[®] reagent. Genomic DNA was eliminated by RNA incubation in gDNA Wipeout Buffer at 42°C for 2 minutes and the RNA was then used directly in reverse transcription (RT). RT was performed with 1 µg of total RNA, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer and RT Primer Mix, according to the supplier's instructions. (Qiagen, Crawley, UK). The primers for the somatostatin receptors were selected from

the NCBI UNISTS databank and those for somatostatin, were used as previously described [59-61] (Table 1). All primers were synthesized and supplied by MWG (Ebersberg, Germany). Each set of primers was tested with at least three different RNA samples that were treated independently. The cDNA was used as template for PCR reaction using platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, UK). Amplification was performed using a Thermocycler (Biometra, Germany) as follows: 94°C for 2 min; 40 cycles of 94°C for 30s; 55-60°C for 60s; and 72°C for 3 min, followed by a final elongation period of 10 min at 72°C. GAPDH was also run as normalizer gene. No-template control PCR was also performed simultaneously with every reaction. The PCR products were separated and visualized in ethidium bromide-stained 2% agarose gel by electrophoresis.

Immunocytochemistry (ICC)

Caco-2 and HT-29 cells were grown on poly-L-lysine-coated coverslips overnight. After the appropriate treatment with octreotide, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in phosphate buffer (pH 6.9) for 40 min at room temperature and washed several times. The specimens were permeabilized and then incubated with 1 µg/ml anti-sst1, anti-sst2A, anti-sst2b, anti-sst3, anti-sst4 or anti-sst5 antibodies, followed by cyanine-conjugated secondary antibodies (Amersham, Braunschweig, Germany). The cells were counter stained with 1 µg/ml DAPI for 1 min, rinsed with PBS, mounted and examined using a Leica TCS-NT laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) [62, 63].

Statistical analysis

Results are shown as mean±standard error of the mean (SEM). All the experiments were performed in triplicates. The statistical significance of the difference between two groups was evaluated by two-tailed Student's t-test or Two-Way ANOVA followed by Bonferroni test correction, using GraphPad Prism 5 (Graph Pad, Software, La Jolla CA, USA). A p-value <0.05 was considered as threshold of significance.

REFERENCES

1. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC: Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 2000, 275:7862-7869.
2. Patel YC: Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999, 20:157-198.
3. Froidevaux S, Eberle AN: Somatostatin analogs and

- radiopeptides in cancer therapy. *Biopolymers* 2002, 66:161-183.
4. Bousquet C, Puente E, Buscail L, Vaysse N, Susini C: Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy* 2001, 47 Suppl 2:30-39.
 5. Cong YS, Wright WE, Shay JW: Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, 66:407-425, table of contents.
 6. Blasco MA: Telomeres and cancer: a tale with many endings. *Curr Opin Genet Dev* 2003, 13:70-76.
 7. Chen CH, Chen RJ: Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc* 2011, 110:275-289.
 8. Lam AK, Saleh S, Smith RA, Ho YH: Quantitative analysis of survivin in colorectal adenocarcinoma: increased expression and correlation with telomerase activity. *Hum Pathol* 2008, 39:1229-1233.
 9. Saleh S, Lam AK, Ho YH: Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in colorectal cancer. *Pathology* 2008, 40:25-30.
 10. Vidaurreta M, Maestro ML, Rafael S, Veganzones S, Sanz-Casla MT, Cerdan J, Arroyo M: Telomerase activity in colorectal cancer, prognostic factor and implications in the microsatellite instability pathway. *World J Gastroenterol* 2007, 13:3868-3872.
 11. Tamakawa RA, Fleisig HB, Wong JM: Telomerase inhibition potentiates the effects of genotoxic agents in breast and colorectal cancer cells in a cell cycle-specific manner. *Cancer Res* 2010, 70:8684-8694.
 12. Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C: Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1014:121-131.
 13. Annunziata M, Luque RM, Duran-Prado M, Baragli A, Grande C, Volante M, Gahete MD, Deltetto F, Camanni M, Ghigo E, et al: Somatostatin and somatostatin analogues reduce PDGF-induced endometrial cell proliferation and motility. *Hum Reprod* 2012, 27:2117-2129.
 14. Oberg KE: The management of neuroendocrine tumours: current and future medical therapy options. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2012, 24:282-293.
 15. Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ: Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2002, 13:451-457.
 16. Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C: Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 2000, 94:205-210.
 17. Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, Zisimopoulos A, Andriotis E, Markidou S, Panagiotakos D, Chrysohoou C, Bazinis A, Paraskevas E: The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer. *Hepatogastroenterology* 2002, 49:1245-1250.
 18. Schulz S, Schulz S, Schmitt J, Wiborny D, Schmidt H, Olbricht S, Weise W, Roessner A, Gramsch C, Holtt V: Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res* 1998, 4:2047-2052.
 19. Weckbecker G, Raulf F, Stolz B, Bruns C: Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer. *Pharmacol Ther* 1993, 60:245-264.
 20. Scarpignato C, Pelosini I: Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Chemotherapy* 2001, 47 Suppl 2:1-29.
 21. Kinova S, Duris I, Kratochvilova E, Ondrejka P, Payer J: Carcinoid tumors--somatostatin in the diagnosis and therapy. *Bratisl Lek Listy* 2002, 103:108-112.
 22. Pinzani P, Orlando C, Raggi CC, Distanto V, Valanzano R, Tricarico C, Maggi M, Serio M, Pazzagli M: Type-2 somatostatin receptor mRNA levels in breast and colon cancer determined by a quantitative RT-PCR assay based on dual label fluorogenic probe and the TaqMan technology. *Regul Pept* 2001, 99:79-86.
 23. Oda Y, Tanaka Y, Naruse T, Sasanabe R, Tsubamoto M, Funahashi H: Expression of somatostatin receptor and effects of somatostatin analog on pancreatic endocrine tumors. *Surg Today* 2002, 32:690-694.
 24. Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A, Wu H, Gadaleanu V, Hansson J, Helboe L, Abrahamsson PA: Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* 2002, 7:91-98.
 25. Papotti M, Croce S, Bello M, Bongiovanni M, Allia E, Schindler M, Bussolati G: Expression of somatostatin receptor types 2, 3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumours. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy. *Virchows Arch* 2001, 439:787-797.
 26. Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC: The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev* 1991, 12:450-482.
 27. Zapata PD, Ropero RM, Valencia AM, Buscail L, Lopez JI, Martin-Orozco RM, Prieto JC, Angulo J, Susini C, Lopez-Ruiz P, Colas B: Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:915-926.
 28. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, Stournaras C, Emmanouel DS, Castanas E: Identification and characterization of opioid and somatostatin binding sites in the opossum kidney (OK) cell line and their effect on growth. *J Cell Biochem* 1996, 63:410-421.
 29. Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Hirohashi M, et al: Antiproliferative activity induced by the somatostatin analogue, TT-232, in human pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer* 2002, 38:1526-1534.

30. Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C: Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2:999-1017.
31. van Essen M, Sundin A, Krenning EP, Kwekkeboom DJ: Neuroendocrine tumours: the role of imaging for diagnosis and therapy. *Nat Rev Endocrinol*, 10:102-114.
32. Tsagarakis NJ, Drygiannakis I, Batistakis AG, Kolios G, Kouroumalis EA: Octreotide induces caspase activation and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2011, 17:313-321.
33. Klironomos S, Notas G, Sfakianaki O, Kiagiadaki F, Xidakis C, Kouroumalis E: Octreotide modulates the effects on fibrosis of TNF-alpha, TGF-beta and PDGF in activated rat hepatic stellate cells. *Regul Pept* 2014, 188:5-12.
34. Samonakis DN, Christodoulakis N, Kouroumalis EA: Octreotide for unresectable hepatocellular carcinoma: beyond the first sight. *J Clin Gastroenterol* 2006, 40:86-87.
35. Kouroumalis E, Samonakis D, Skordilis P: Octreotide treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003, 37:477.
36. Samonakis DN, Moschandreas J, Arnaoutis T, Skordilis P, Leontidis C, Vafiades I, Kouroumalis E: Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues. *Oncol Rep* 2002, 9:903-907.
37. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON: Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut* 1998, 42:442-447.
38. Xu W, Zhou YF, Xia SH: Octreotide for primary moderate to severe acute pancreatitis: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology* 2013, 60:1504-1508.
39. Notas G, Kolios G, Mastrodimitou N, Kampa M, Vasilaki A, Xidakis C, Castanas E, Thermos K, Kouroumalis E: Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors. *J Hepatol* 2004, 40:792-798.
40. Gao S, Yu BP, Li Y, Dong WG, Luo HS: Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J Gastroenterol* 2003, 9:2362-2365.
41. Wang S, Bao Z, Liang QM, Long JW, Xiao ZS, Jiang ZJ, Liu B, Yang J, Long ZX: Octreotide stimulates somatostatin receptor-induced apoptosis of SW480 colon cancer cells by activation of glycogen synthase kinase-3beta, A Wnt/beta-catenin pathway modulator. *Hepatogastroenterology*, 60:1639-1646.
42. Chen JS, Liang QM, Li HS, Yang J, Wang S, Long JW: Octreotide inhibits growth of colonic cancer SW480 cells by modulating the Wnt/P-catenin pathway. *Pharmazie* 2009, 64:126-131.
43. Hu C, Yi C, Hao Z, Cao S, Li H, Shao X, Zhang J, Qiao T, Fan D: The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004, 3:726-730.
44. Feng RH, Zhu ZG, Li JF, Liu BY, Yan M, Yin HR, Lin YZ: Inhibition of human telomerase in MKN-45 cell line by antisense hTR expression vector induces cell apoptosis and growth arrest. *World J Gastroenterol* 2002, 8:436-440.
45. Blackburn EH: Telomerases. *Annu Rev Biochem* 1992, 61:113-129.
46. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC: Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990, 346:866-868.
47. Hao ZM, Luo JY, Cheng J, Wang QY, Yang GX: Design of a ribozyme targeting human telomerase reverse transcriptase and cloning of it's gene. *World J Gastroenterol* 2003, 9:104-107.
48. Yakoob J, Hu GL, Fan XG, Zhang Z: Telomere, telomerase and digestive cancer. *World J Gastroenterol* 1999, 5:334-337.
49. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T: High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6:2696-2701.
50. Pawlikowski M, Lachowicz L, Kunert-Radek J, Winczyk K, Janiszewska G, Szkudlarek J: Differential effects of somatostatin and its analog on protein tyrosine kinases activity in the rat pituitary and the murine colonic tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 246:375-377.
51. Katic M, Kahn CR: The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62:320-343.
52. Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergstrom R, Signorello LB, Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D: Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90:911-915.
53. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998, 351:1393-1396.
54. Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X: Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:151-156.
55. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ: Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:620-625.
56. Wetterau LA, Francis MJ, Ma L, Cohen P: Insulin-like growth factor I stimulates telomerase activity in prostate cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88:3354-3359.
57. Baron-Delage S, Capeau J, Barbu V, Chastre E, Levy P, Gespach C, Cherqui G: Reduced insulin receptor expression and function in human colonic Caco-2 cells by ras and polyoma middle T oncogenes. *J Biol Chem* 1994, 269:18686-18693.

58. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65:55-63.
59. Talme T, Ivanoff J, Hagglund M, Van Neerven RJ, Ivanoff A, Sundqvist KG: Somatostatin receptor (SSTR) expression and function in normal and leukaemic T-cells. Evidence for selective effects on adhesion to extracellular matrix components via SSTR2 and/or 3. *Clin Exp Immunol* 2001, 125:71-79.
60. Ejeskar K, Abel F, Sjoberg R, Backstrom J, Kogner P, Martinsson T: Fine mapping of the human precortistatin gene (CORT) to neuroblastoma consensus deletion region 1p36.3-->p36.2, but absence of mutations in primary tumors. *Cytogenet Cell Genet* 2000, 89:62-66.
61. Robas N, Mead E, Fidock M: MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 2003, 278:44400-44404.
62. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Hollt V, Schulz S: Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem* 2001, 276:14027-14036.
63. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Hollt V, Schulz S: Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 2002, 277:19762-19772.