

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	12
1. ΟΡΙΣΜΟΙ.....	12
2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	12
2Α. Κυτταρικός κύκλος.....	14
2Β. Γονίδια.....	17
α) ογκογονίδια.....	20
β) ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	23
γ) γονίδια επιδιόρθωσης του DNA.....	26
3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	27
4. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΩΝ.....	31
5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ.....	33
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ.....	37
ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	41
1. ΟΡΙΣΜΟΙ.....	41
2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	41
3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ – ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	43
3Α. Ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα.....	43

3B. Δείκτες διαφοροποίησης.....	44
3Γ. Δείκτες ρυθμού ανακύκλωσης των κυττάρων.....	44
3Δ. Δείκτες τραυματισμού οργάνων/απάντησης ξενιστού.....	44
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	46
1. ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ – ΓΕΝΙΚΑ.....	46
2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	47
3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ...49	
3Α. Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	49
3B. Ενδογενείς παράγοντες.....	52
4. ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	64
4Α. Νεοπλασματικοί πολύποδες.....	65
4B. Μη νεοπλασματικοί πολύποδες.....	69
5. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	71
5Α. Προγονικά κύτταρα – ανώμαλος κυτταρικός πολλαπλασιασμός.72	
5B. Μοριακή γενετική.....	77
6. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.84	
6Α. Σύνδρομο αδενωματώδους πολυποδίασης.....	85
6B. Σύνδρομο αμαρτωματώδους πολυποδίασης.....	87
6Γ. Σύνδρομο υπερπλαστικής πολυποδίασης.....	89
6Δ. Κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου90	

7. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	93
8. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	93
9. ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	96
9Α.Κλινικοπαθολογικοί δείκτες.....	97
9Β. Μοριακοί δείκτες.....	99
10. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ.....	100
α) ασβέστιο και βιταμίνη D.....	101
β) φυλλικό οξύ.....	102
γ) σελήνιο.....	102
δ) αντιοξειδωτικοί παράγοντες.....	102
ε) προβιοτικά.....	102
στ) ασπιρίνη – μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ).....	103
ζ) αναστολείς της HMG-CoA ρεδουκτάσης.....	104
η) ορμονική θεραπεία υποκατάστασης.....	105
θ) φυσική δραστηριότητα.....	105
11. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	106
11Α. Συμπτώματα.....	106
11Β. Σημεία.....	107
11Γ. Εργαστηριακά ευρήματα.....	107
11Δ. Ασυνήθεις κλινικές εκδηλώσεις.....	107

12. ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	108
13. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	111
14. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΟΛΥΠΟΔΩΝ - ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.	116
14Α. Πολύποδες.....	116
14Β. Καρκίνος.....	117
15. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ – ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	122
15Α. Αδενωματώδεις πολύποδες παχέος εντέρου.....	122
15Β. Καρκίνος παχέος εντέρου.....	123

ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΕΣ ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ

.....	125
1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ.....	126
α) ο ρόλος της μεθυλίωσης στην επεξεργασία των RNAs.....	127
β) ο ρόλος της μεθυλίωσης στη ρύθμιση της μεταγραφής.....	128
γ) ο ρόλος της μεθυλίωσης στη μεταγωγή σήματος.....	129
δ) ο ρόλος της μεθυλίωσης στην επιδιόρθωση του DNA.....	130
ε) οι μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης στον καρκίνο.....	130
2. PRMT1.....	132
2Α. Τα υποστρώματα της PRMT1.....	134
2Β. Συμμετοχή της PRMT1 στις διάφορες ασθένειες.....	138

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PRMT1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	141
1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	142
α) απομόνωση ολικού RNA.....	142
β) προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας RNA.....	142
γ) σύνθεση cDNA.....	143
δ) πολλαπλασιασμός του cDNA του PRMT1.....	144
ε) προσδιορισμός της αλληλουχίας για την ταυτοποίηση των ισομορφών του PRMT1.....	145
στ) προσδιορισμός της συγκέντρωσης των προϊόντων της PCR..	145
ζ) παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων.....	145
η) υπολογισμός τίτλου αντισωμάτων.....	146
θ) συλλογή και καθαρισμός αντισώματος.....	147
ι) υπολογισμός συγκέντρωσης αντισώματος.....	148
κ) ταυτοποίηση ανοσοσφαιρινών.....	149
λ) ανοσοϊστοχημεία.....	150
μ) στατιστική ανάλυση.....	151
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	151
2Α. Μελέτη των προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου PRMT1.....	151

2B. Μελέτη της έκφρασης του PRMT1 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	154
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	161
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	165
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	168

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (ABBREVIATIONS)

EK: Ελκώδης Κολίτις

ΙΦΝΕ: Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νοσήματα του Εντέρου

ΚΠΕ: Καρκίνος του Παχέος Εντέρου

ΜΒ: Μοριακό Βάρος

ΜΣΑΦ: Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα

ΝC: Νόσος του Crohn

ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

ΠΟΥ: Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας

ΤΚΕ: Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθροκυττάρων

ΧΜΛ: Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

ADMA: Asymmetric Dimethylarginine

aFP: alpha-fetoprotein

AJCC: American Joint Committee on Cancer

APC: Adenomatous Polyposis Coli (gene)

APCs: Antigen-presenting Cells

ATM: Ataxia Telangiectasia

BE: Barium Enema

BMI: Body Mass Index

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BRCA: Breast Cancer susceptibility genes

Ca: Cancer

CDAI: Crohn's Disease Activity Index

CDK: Cyclin-dependent Kinase

cDNA: single-stranded DNA complementary to RNA

CEA: Carcinoembryonic Antigen
CIMP: CpG Island Methylator Phenotype
CIN: Chromosome Instability
CK: Cyclin Kinase
CMV: Cytomegalovirus
COX-2: Cyclooxygenase-2
CRP: C Reactive Protein
CT: Computed Tomography
DCC: Deleted in Colorectal Carcinoma (gene)
DFS: Disease Free Survival
DNA: Deoxyribonucleic Acid
DNA-PK: DNA-Protein Kinase
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EMT: Epithelial Mesenchymal Transition
ER: Estrogen Receptor
EUS: Endoscopic UltraSound
FAK: Focal Adhesion Kinase
FAP: Familial Adenomatous Polyposis
5-FU: 5-Fluorouracil
FNA: Fine Needle Aspiration
FOBT: Fecal Occult Blood Testing
FXR: Farnesoid X Receptor
GTSG: Gastrointestinal Tumor Study Group
HBV: Hepatitis B Virus
hCG: human Chorionic Gonadotrophin

HCV: Hepatitis C Virus

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HMGs: High Motility Group proteins

HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

HPS: Hyperplastic Polyposis Syndrome

HPV: Human Papilloma Virus

IARC: International Agency for Research on Cancer

ILF3: Interleukin enhancer binding factor 3

IOUS: Intraoperative Ultrasonography

IR: Insulin Receptor

ISEMFs: Intestinal Subepithelial Myofibroblasts

LOH: Loss of Heterozygosity

LV: Leucovorin

MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase

MBD: Methyl DNA binding protein

MBP: Myelin Basic Protein

MEN: Multiple Endocrine Neoplasia

miRNAs: MicroRNAs

MMR: Mismatch Repair (system)

MMPs: Matrix Metalloproteinases

MRI: Magnetic Resonance Imaging

MSI: Microsatellite Instability

MSS: Microsatellite Stability

MTA: Methylioadenosine

MTAP: Methylioadenosine phosphorylase

NBI: Narrow Band Imaging

NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells

NOS: Nitric Oxide Synthase

OS: Overall Survival

PAI-1: Plasminogen-activator Inhibitor type-1

PCR: Polymerase Chain Reaction

PIAS1: Protein Inhibitor of Activated STAT1

PJS: Peutz-Jeghers Syndrome

PRMT: Protein Arginine Methyltransferase

PSA: Prostate-specific Antigen

Rb: Retinoblastoma (gene)

RBPs: RNA Binding Proteins

RNA: Ribo Nucleic Acid

RFA: Radiofrequency Ablation

RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR

SC: Stem Cell

Shh: Sonic Hedgehog

SMN: Motor Neuron protein

SnRNP: Small nuclear Ribonucleoprotein

SSA: Sessile Serrated Adenoma

TCR: T-cell Receptor

TGF: Tumor Growth Factor

TLRs: Toll Like Receptors

TMUGS: Tumor Marker Utility Grading System

TNF: Tumor Necrosis Factor

uPA: urokinase-type Plasminogen

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WHO: World Health Organization

Wnt: Wingless (path)

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1. ΟΡΙΣΜΟΙ

Η λέξη **όγκος**, χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την περιγραφή διόγκωσης φλεγμονώδους αιτιολογίας. Στη σύγχρονη ιατρική, όμως, ο όρος **όγκος** προσδιορίζει μια μάζα μη φυσιολογικού ιστού, η οποία προέρχεται από έναν αυτόνομο και ταυτόχρονα ανώμαλο πολλαπλασιασμό κυττάρων, ο οποίος επιμένει ακόμη και μετά την απομάκρυνση του εναρκτήριου ερεθίσματος.

Εντούτοις, ο όρος **νεόπλασμα** – συνώνυμος του όρου όγκος - φαίνεται ότι είναι προτιμητέος, αφού παρέχει μεγαλύτερη σαφήνεια ενώ ταυτόχρονα έχει λιγότερο ανησυχητικό – ηχητικά - αντίκτυπο στους ασθενείς (1).

Η παρουσία ενός μεμονωμένου, μη φυσιολογικού κυττάρου, το οποίο δεν πολλαπλασιάζεται περισσότερο από τα γειτονικά του φυσιολογικά κύτταρα, δεν προκαλεί ιδιαίτερη ζημία, ανεξάρτητα από τις λοιπές δυσμενείς ιδιότητες που μπορεί να παρουσιάζει. Εάν, όμως, ο πολλαπλασιασμός ξεφύγει από τον έλεγχο, θα αναπτυχθεί ένας όγκος ή νεόπλασμα. Για όσο χρονικό διάστημα τα νεοπλασματικά κύτταρα παραμένουν σε μια ενιαία μάζα ο όγκος ονομάζεται καλοήθης και συνήθως είναι πλήρως ιάσιμος. Όταν τα κύτταρα ενός όγκου αποκτήσουν την ικανότητα να διηθούν γειτονικούς ιστούς τότε ο όγκος χαρακτηρίζεται ως κακοήθης (2).

Η καθιέρωση του όρου **καρκίνος** έγινε την εποχή του Γαληνού (130 – 200 μΧ). Ο ίδιος ο Γαληνός παρομοίασε την κεντρική μάζα ενός όγκου με το σώμα του ζώου καρκίνος και τις διογκωθείσες φλέβες γύρω από τον όγκο με τα πόδια του ζώου αυτού.

Στις ημέρες μας, ο όρος καρκίνος, χρησιμοποιείται για να περιγράψει με γενικό τρόπο την παρουσία ενός κακοήθους νεοπλασματος (1).

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η νεοπλασματική νόσος – σύμφωνα με επαρκή ιστορικά στοιχεία – προσβάλλει το ανθρώπινο είδος από τους προϊστορικούς, ήδη, χρόνους. Ο ίδιος ο Ιπποκράτης (460 – 370 πΧ) πρότεινε πρώτος μια θεωρητική βάση εξήγησης της διηθητικής ικανότητας του καρκίνου: νόσος με περίσσεια μαύρης χολής, του ενός δηλαδή από τους τέσσερις χυμούς του σώματος (μαύρη χολή, κίτρινη χολή, αίμα και φλέγμα).

Η κυτταρική αιτιολογία του καρκίνου περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1828, από τον Johannes Peter Mueller (3).

Η διερεύνηση των μηχανισμών καρκινογένεσης αποτελεί τη λυδία λίθο τόσο για την αναγνώριση όσο και για την αξιολόγηση των παραγόντων εκείνων, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον σχεδιασμό και στην περαιτέρω εφαρμογή προληπτικών παρεμβάσεων στο γενικό πληθυσμό αλλά και στη βελτίωση των παρεχομένων θεραπευτικών επιλογών.

Παρότι, όμως, έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερη πρόοδος στην περιγραφή της βιολογίας του καρκίνου, δεν συναντάται το ίδιο και στην εξακρίβωση της/ων αιτίας/ών και του τρόπου/ων μέσω του/ων οποίου/ων ένα ευκαρυωτικό κύτταρο υφίσταται κακοήθη εξαλλαγή (4).

Η φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων ενός ζωντανού οργανισμού βασίζεται στην αρμονική συνεργασία τριών βασικών εξεργασιών : του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (κυτταρική απόπτωση).

Ο καρκίνος προκύπτει από διαταραχή των ρυθμιστικών μηχανισμών ενός κυττάρου που οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και στην αδυναμία ολοκλήρωσης του προγράμματος κυτταρικής διαφοροποίησης.

Αυτές οι σοβαρές διαταραχές έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στα κύτταρα προϊούσας γονιδιακής αστάθειας, αδυναμίας φυσιολογικής γήρανσης και απόκτησης διηθητικής ικανότητας στους γειτονικούς ιστούς (1).

Ο συνδυασμός της βιολογικής συμπεριφοράς αυτών των τροποποιημένων κυττάρων με την αντίδραση του ξενιστή είναι υπεύθυνος για τις εκδηλώσεις της καρκινικής νόσου.

Όπως φαίνεται, η κακοήθης εξαλλαγή οφείλεται σε σταδιακή συσσώρευση πολλαπλών αλλοιώσεων σε κρίσιμα γονίδια του κυττάρου. Οι αλλοιώσεις αυτές λαμβάνουν χώρα με διαδοχικό τρόπο και για μακρό χρονικό διάστημα στα κύτταρα. Έχει υπολογισθεί, για παράδειγμα, ότι στο γονιδίωμα ενός καρκινικού κυττάρου του παχέος εντέρου υπάρχουν περί τις 11.000 μεταλλάξεις. Ένα, όμως, κύτταρο είναι αυτό το οποίο θα αποκτήσει ικανότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και θα δημιουργήσει θυγατρικά κύτταρα με τα ίδια γενετικά χαρακτηριστικά και με αυτό τον τρόπο εξηγείται η επικρατούσα θεώρηση της μονοκλωνικής προέλευσης του καρκίνου(1,4).

Με βάση νεότερες θεωρίες για την καρκινογένεση, το κύτταρο που υφίσταται κακοήθη εξαλλαγή δεν είναι διαφοροποιημένο, αλλά αντιπροσωπεύει προγονικό ή ακόμη και βλαστικό κύτταρο (stem cell). Αποθέματα βλαστικών κυττάρων απαντώνται σε όλους τους ιστούς. Ως εκ τούτου, ως τρέχον μοντέλο ογκογένεσης έχει προταθεί το <<ιεραρχικό>>, με βάση το οποίο στην κορυφή της ιεραρχίας βρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου. Τα διαφοροποιά χαρακτηριστικά αυτών των βλαστικών καρκινικών κυττάρων – σε σχέση με τα υπόλοιπα καρκινικά - είναι τα παρακάτω:

- α) χαμηλός ρυθμός / αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού
- β) αυξημένη έκφραση αντλιών στην κυτταρική μεμβράνη που αποκλείουν την ύπαρξη βλαπτικών ουσιών κλπ στο κυτταρόπλασμα
- γ) ικανότητα διαφοροποίησης προς όλες τις κατευθύνσεις που αφορούν τον καρκίνο
- δ) αντοχή τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στις <<στοχευμένες>> θεραπείες κατά τη μεταγωγή του σήματος, που αποτελούν τη σύγχρονη θεραπευτική τάση
- ε) ικανότητα μετανάστευσης και ανάπτυξης μεταστάσεων σε θέσεις όπου παραμένουν ακόμη και για χρόνια μέχρι να λάβουν το σήμα για ενεργοποίηση
- στ) υιοθέτηση οδών μεταγωγής του σήματος.

Τα καρκινικά κύτταρα, λοιπόν, έχουν αποκτήσει ιδιότητες που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά και φέρουν γενετικές αλλαγές που επάγουν την ογκογένεση.

Σύμφωνα με τον ορισμό της σύγχρονης βιολογίας, τα έξι χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου είναι:

- αυτό-επάρκεια σε μηνύματα αύξησης
- αποφυγή απόπτωσης
- απουσία ευαισθησίας σε αντι-αυξητικά μηνύματα
- δυνατότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού
- επαρκής αγγειογένεση
- διήθηση – μετάσταση (4).

Τα διάφορα είδη καρκίνου στον άνθρωπο, παρά τις διαφορές που εμφανίζουν, έχουν ορισμένες κοινές ιδιότητες, που καθένα τις εκφράζει σε διαφορετικό βαθμό. Επιπρόσθετα, αυτές οι ιδιότητες, μπορεί να εμφανισθούν σταδιακά, σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου, και καθεμία ξεχωριστά να ανευρεθεί και σε άλλες ασθένειες ή να αποτελέσει μέρος φυσιολογικών προσαρμοστικών διαδικασιών. Όμως, ο συνδυασμός ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τροποποιημένης διαφοροποίησης και μεταβολισμού με τη γενετική αστάθεια και την ικανότητα εξάπλωσης είναι μοναδικός και χαρακτηρίζει αποκλειστικά τον καρκίνο.

Ο καρκίνος, λοιπόν, θεωρείται ότι έχει μονοκλωνική προέλευση, με σημαντικότερες γενετικές αλλοιώσεις τις μεταλλάξεις δύο ομάδων γονιδίων: των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Η προϊούσα συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών σε μορφολογικό επίπεδο οδηγεί σε προκαρκινικές αλλοιώσεις ιστών και οργάνων που χαρακτηρίζονται ως δυσπλασία.

Γενικά, η αύξηση του αριθμού των κύτταρων σε ένα ιστό ονομάζεται υπερπλασία. Όταν η υπερπλασία συνοδεύεται από επιπρόσθετες αλλαγές, όπως εκείνες που αφορούν τη διαφοροποίηση, οδηγεί στην ανάπτυξη δυσπλασίας.

Η δυσπλασία, ως ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού, ανάλογα με το επίπεδο απόκλισης από τον καρκινικό ορίζεται ως χαμηλόβαθμη ή υψηλόβαθμη.

Τα όρια μεταξύ υπερπλασίας, καλοήθους όγκου και καρκίνου είναι συχνά εμφανή με μικροσκοπική ή μακροσκοπική εξέταση. Πάραυτα, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να απαιτηθούν επιπρόσθετα κριτήρια ή δείκτες για την πραγματοποίηση μιας τέτοιας διάκρισης (1).

Στις επόμενες παραγράφους θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στο φυσιολογικό κύκλο ζωής ενός κυττάρου καθώς και στους βασικούς μηχανισμούς που διέπουν την κακοήθη μετατροπή της συμπεριφοράς του.

2^A. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Κάθε ζωντανός οργανισμός αποτελείται από επιμέρους ανατομικές και λειτουργικές μονάδες, τα κύτταρα. Ομάδες κυττάρων με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά και λειτουργία αποτελούν τους ιστούς, οι οποίοι με τη σειρά τους, διαπλεκόμενοι μεταξύ τους, σχηματίζουν τα όργανα.

Προκειμένου να διασφαλιστεί η ανάπτυξη και η ομοιόσταση του κυττάρου και κατ'επέκταση του ιστού, του οργάνου και εν τέλει του οργανισμού, το κάθε κύτταρο αναπαράγει ένα πανομοιότυπο αντίγραφο του μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρικός κύκλος.

Κάθε κυτταρικός κύκλος θα πρέπει να πραγματοποιείται υπό τον έλεγχο αυστηρών ρυθμιστικών μηχανισμών, η απουσία των οποίων προδιαθέτει σε δημιουργία γενετικής αστάθειας με πιθανό επακόλουθο την προδιάθεση για ανάπτυξη κακοήθειας. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η συνέχιση ή η διακοπή του, δεν αποτελεί τίποτε άλλο παρά την απάντηση του κυττάρου σε ποικίλα εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν είτε τροποποίηση του κύκλου ή παραγωγή και απελευθέρωση συγκεκριμένων κυτταρικών προϊόντων (π.χ. πρωτεϊνών). Τα εξωτερικά ερεθίσματα (π.χ. αντιμιτωτικοί παράγοντες) επιδρούν σε συγκεκριμένους διαμεμβρανικούς υποδοχείς του κυττάρου. Όταν ο κάθε συγκεκριμένος εξωτερικός παράγοντας προσκολληθεί στον ανάλογο υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί συνήθως την ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου βιοχημικού μηχανισμού που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή συγκεκριμένης «απάντησης» του κυττάρου στο εξωγενές ερέθισμα. Η συγκεκριμένη διαδικασία αποτελεί αντικείμενο έρευνας προς την κατεύθυνση της σύνθεσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία με τη σύνδεσή τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς προκαλούν την απενεργοποίησή τους με αποτέλεσμα την λύση του κυττάρου ή την προαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης.

Φυσιολογικά, κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις φάσεις :

A) Φάση G1: κατά τη διάρκειά αυτής το κύτταρο υποβάλλεται σε πολύπλοκες βιοχημικές διεργασίες, που προετοιμάζουν την είσοδό του στην επόμενη φάση.

B) Φάση S : κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, το του κυττάρου αντιγράφει τον εαυτό του με εξαιρετική ακρίβεια, δίνοντας γένεση σε ένα πανομοιότυπο αντίγραφο του (θυγατρικό DNA).

Γ) Φάση G2 : το κύτταρο προετοιμάζεται για την είσοδό του στην επόμενη φάση, τη φάση της μίτωσης.

Δ) Φάση M : το διπλασιασμένο DNA, καθώς διαχωρίζεται με ακρίβεια σε δύο ίσα μέρη, συμπυκνώνεται και σχηματίζει τα χρωμοσώματα. Με αυτό τον τρόπο, τα δύο θυγατρικά κύτταρα, αποκτούν το καθένα ένα ακριβές αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου.

Εκτός από τις τέσσερις προαναφερθείσες φάσεις, υπάρχει και η φάση G0 (φάση ηρεμίας). Το κάθε κύτταρο που προέκυψε από τη μιτωτική διαίρεση μπορεί, αντί της εισόδου στη φάση G1 για μια νέα διαίρεση, να εισέλθει σε φάση ηρεμίας άλλοτε άλλης διάρκειας ανάλογα με τις ανάγκες του ιστού, του οργάνου ή του οργανισμού.

Η επιλογή εισόδου του κυττάρου στη φάση G0 αντί της G1 καθορίζεται από διάφορα εξωγενή ερεθίσματα (παρουσία ή έλλειψη μιτογόνων ή άλλων παραγόντων).

Οποιαδήποτε χρονική στιγμή, η φάση ηρεμίας μπορεί να μεταπέσει σε φάση G1 υπό την επίδραση των εν λόγω εξωτερικών ερεθισμάτων. Το σημείο μετάπτωσης από την φάση G0 στη φάση G1 ονομάζεται περιοριστικό σημείο ή σημείο R, αφού μετά τη δίοδό του από αυτό, το κύτταρο δεν υπακούει πλέον στους εξωγενείς παράγοντες και η πορεία του μέχρι την ολοκλήρωση της μίτωσης είναι προκαθορισμένη.

Σε αρκετούς ιστούς, η φάση G₀ είναι επικρατέστερη και το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων τους βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (λεμφικός ιστός, σκελετικοί μύες, λιπώδης ιστός, νευρικός ιστός κ.α.). Σε κάποιους από αυτούς, όπως ο λεμφικός ιστός, η φάση G₀ είναι αντιστρεπτή υπό την επίδραση των διεγερτικών παραγόντων, ενώ σε άλλους, όπως οι σκελετικοί μύες και οι νευρώνες, είναι μη αντιστρεπτή.

Πολλαπλά σημεία ελέγχου (checkpoints), τα οποία βρίσκονται σε διάφορα χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου, διασφαλίζουν την ακρίβεια και το τέλειο αποτέλεσμα της όλης διαδικασίας. Τα σημεία αυτά, βάσει συγκεκριμένων ερεθισμάτων, επιτρέπουν τη συνέχιση και την ολοκλήρωση του κύκλου ή ευνοούν την αναστολή του. Οι παράγοντες εκείνοι που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι οι εξής: α) οι κυκλίνες, δηλαδή πρωτεϊνικά συμπλέγματα (A, B, D, E) που διακρίνονται σε οικογένειες εκ των οποίων έκαστη είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο διαφορετικής φάσης του κύκλου, β) κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDK) – κάθε κινάση επάγει τη δράση μιας κυκλίνης και γ) αναστολείς των συμπλεγμάτων κυκλινών – κινασών (CKI, CDK inhibitors).

Για την έναρξη και την ολοκλήρωση της κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου, θα πρέπει πρώτα να έχει βεβαιωθεί η επιτυχής ολοκλήρωση της αμέσως προηγούμενης φάσης. Τα σημεία ελέγχου ενεργοποιούνται από διάφορους ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες (θερμοκρασία, διατροφικοί παράγοντες, ιοντίζουσα ακτινοβολία, βλάβη του DNA κ.ο.κ.)

Μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των ρυθμιστικών παραγόντων (σημείων ελέγχου), οδηγούν στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του βεβλαμμένου κυττάρου, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Οι ίδιες μεταλλάξεις, έχουν επιρροή και στην ευαισθησία του κυττάρου, καρκινικού ή μη και στην κυτταροτοξική δράση εξωτερικών παραγόντων όπως η χημειοθεραπεία ή η ακτινοθεραπεία.

Αναλυτικότερα, τα σημεία ελέγχου των φάσεων του κυτταρικού κύκλου έχουν ως εξής:

- Μετάβαση από τη φάση G₁ στην S: το σημείο ελέγχου αποτελεί η ενεργοποίηση ή μη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 - και πιθανόν των συγγενών του γονιδίων p63 και p73 - που λειτουργεί ως φραγμός στη συνέχιση του κύκλου με δύο τρόπους: α) βλάβη του DNA προκαλεί ενεργοποίηση του p53 γονιδίου που με τη σειρά του προκαλεί ενεργοποίηση του p21 CKI με αποτέλεσμα αναστολή του συμπλέγματος κυκλινών / CDK και αναχαίτιση στην G₁ → S. β) ενεργοποίηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω του p53. Το ποια από τις δυο διαδικασίες θα ακολουθηθεί είναι άγνωστο. Σε περίπτωση μετάλλαξης του p53 προάγεται η καρκινογένεση, διότι το κύτταρο πλέον, λόγω απουσίας αναστολής του κυτταρικού κύκλου αυξάνεται ενώ ένεκα απενεργοποίησης της διαδικασίας της απόπτωσης τα προβληματικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται.
- Φάση S: μία κινάση πυρήνα – κυτταροπλάσματος, η σύνθεση της οποίας κωδικοποιείται από το γονίδιο ATM, προάγει την φωσφορυλίωση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα σημεία ελέγχου της βλάβης και επισκευής του DNA.
- Μετάβαση από τη φάση G₂ στη M: το σημείο ελέγχου είναι η ενεργοποίηση του συμπλέγματος κυκλίνης B / CDK1 το οποίο προκαλεί αναχαίτιση του

κυτταρικού κύκλου ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες επιτρέπει στο κύτταρο να περάσει στη φάση της μίτωσης. Η ενεργοποίηση μιας τέτοιας διαδικασίας αποτελεί σημαντικότερο παράγοντα για την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων προς την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Τα εμπλεκόμενα γονίδια είναι : RAD9, RAD17, RAD24, MEC1, MEC2 και MEC3.

- Φάση M: η μίτωση ολοκληρώνεται σε τέσσερις διαδοχικές φάσεις που είναι η πρόφαση, η μετάφαση, η ανάφαση και η τελόφαση. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης (μέση διάρκεια = 1 ώρα) το κύτταρο, έχοντας ήδη διπλασιάσει το γενετικό του υλικό και φτιάξει δύο πανομοιότυπα αντίγραφα, είναι έτοιμο να δημιουργήσει δύο όμοια θυγατρικά κύτταρα με το καθένα να περιέχει το ένα από τα δύο ζεύγη ελίκων του DNA που προέκυψαν στη φάση S. Οποιαδήποτε ανωμαλία προκύψει κατά τη διάρκεια αυτής της σημαντικότερης φάσης, δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί. Το σημείο ελέγχου εστιάζεται στη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση. Τα εμπλεκόμενα γονίδια είναι : MAD1, MAD2, MAD3, BUB1, BUB2, BUB3 και πιθανόν το p53. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια οδηγούν σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες οι οποίες μπορεί να προάγουν την καρκινογένεση.

Κυτταρική γήρανση: αποτελεί σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που πραγματοποιείται μέσω του ενζύμου τελομεράση. Η τελομεράση είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη, η οποία συντηρεί το μήκος των τελομεριδίων. Τα τελομερίδια είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στα άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων. Στα 46 χρωμοσώματα του ανθρωπίνου κυττάρου υπάρχουν 92 τελομερίδια. Σε φυσιολογικά κύτταρα, υπάρχει σταδιακή βράχυνση των τελομεριδίων μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση που οδηγεί βαθμιαία στην κατάργηση της ικανότητας των κυττάρων για διαίρεση. Η συγκεκριμένη διαδικασία φαίνεται ότι συνδέεται με τη φυσιολογική γήρανση των κυττάρων. Ενεργός τελομεράση ανιχνεύεται σε φυσιολογικούς εμβρυϊκούς ιστούς και σε φυσιολογικά γεννητικά κύτταρα καθώς επίσης και στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα τα οποία καθιστά «αθάνατα». Το ένζυμο δεν είναι ανιχνεύσιμο στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα με εξαίρεση τα κύτταρα ανανέωσης των ιστών (π.χ. αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, κύτταρα των εντερικών κρυπτών, κύτταρα του ενδομητρίου κλπ).

Γενικότερα, τα πλέον σημαντικά σημεία του κυτταρικού κύκλου είναι η είσοδος στη μίτωση, η μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση και η έξοδος από τη μίτωση (1).

2B.ΓΟΝΙΔΙΑ

Τα τελευταία χρόνια η γενετική του καρκίνου έχει παρουσιάσει αλματώδη εξέλιξη. Για την ιστορία, το 1890, ο Γερμανός παθολογοανατόμος David Von Hansermann, κατέγραψε την παρουσία ανωμαλιών κατά τη διάρκεια της διαίρεσης των νεοπλασματικών κυττάρων και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι αυτά τα φαινόμενα έχουν άμεση σχέση με την ανάπτυξη των νεοπλασιών. Λίγο αργότερα, ο Theodor Boveri, διατύπωσε τη θεωρία ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποτελούν το αίτιο του καρκίνου.

Εντούτοις, η περιγραφή του χρωμοσώματος Φιλαδελφείας, το 1960, από τους Nowell και Hungerford, υπήρξε ένας από τους σημαντικότερους σταθμούς για τη γενετική του καρκίνου ενώ η μετέπειτα συσχέτιση του συγκεκριμένου χρωμοσώματος με τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία οδήγησε στην αναζήτηση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε άλλα είδη νεοπλασμάτων.

Στη συνέχεια, η ανακάλυψη τεχνικών χρώσης των χρωμοσωμάτων με τις οποίες κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση τους και η ανάδειξη των δομικών ανωμαλιών που φέρουν, η ανάδειξη σταθερών χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε ειδικούς τύπους καρκίνου και η ραγδαία εξέλιξη της μοριακής γενετικής και κυτταρογενετικής συνέβαλαν στην ακριβέστερη και μεθοδικότερη προσέγγιση των μηχανισμών της καρκινογένεσης.

Η απομόνωση και μελέτη, πλέον, γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση ήταν γεγονός.

Στις ημέρες μας, είναι γνωστό ότι ο καρκίνος αποτελεί μια πολυσταδιακή και πολυγονιδιακή διαταραχή, που προκύπτει από την συσσώρευση επίκτητων ή/και κληρονομικών μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια. Η κάθε μετάλλαξη φαίνεται ότι εμφανίζει ειδικότητα ως προς τον τύπο του γονιδίου και του ιστού (1).

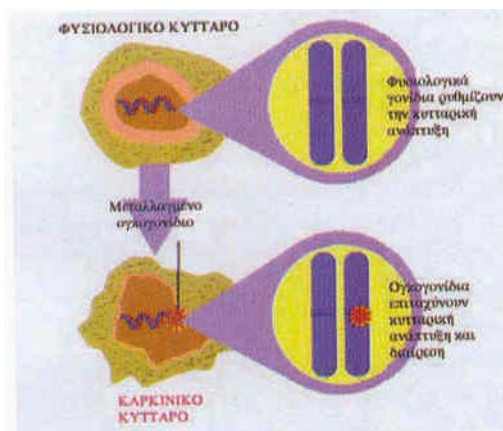
Εν συντομία, οι κύριοι παράγοντες που εμπλέκονται στην πρόκληση των ανωτέρω μεταλλάξεων είναι οι εξής :

- Εγγενείς αλλαγές της γενετικής πληροφορίας. Ενδογενείς διαδικασίες μπορεί να μεταβάλλουν το περιεχόμενο πληροφοριών του DNA. Αυτές οι διαδικασίες δεν διαχωρίζονται από τη λειτουργία και τα χαρακτηριστικά των οργανισμών και επηρεάζονται από εξωτερικούς παράγοντες σε μικρή έκταση.
- Σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA. Η διαδικασία της αντιγραφής δεν επιτελείται με απόλυτη ακρίβεια και ο ρυθμός λάθους κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA είναι κατά προσέγγιση μια λάθος ενσωμάτωση ανά $10^6 - 10^8$ σωστά τοποθετημένα νουκλεοτίδια.
- «Αυθόρμητες» βλάβες στο DNA. Το DNA έχει μειωμένη σταθερότητα στις συνθήκες θερμοκρασίας και pH που επικρατούν στους ζωντανούς οργανισμούς. Από τους παράγοντες που προκαλούν συχνότερα βλάβες στο DNA είναι το ενεργό οξυγόνο, κυρίως υπό μορφήν υπεροξειδικού ανιόντος και ριζών υδροξυλίου. Πολλά χημικά συστατικά των τροφών που καταναλώνουμε μπορεί να αντιδράσουν με το DNA ή να μετατραπούν μέσω του μεταβολισμού σε ενώσεις με υψηλό δυναμικό πρόκλησης βλαβών στο DNA.
- Εξωγενείς βλάβες στο DNA. Αρκετοί εξωτερικοί παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο DNA των κυττάρων και άρα και μεταλλάξεις. Τέτοιοι παράγοντες είναι χημικές ενώσεις με καρκινογενετική δράση, η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες X και άλλου είδους ακτινοβολίες με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο (π.χ. ραδιενέργεια).
- Ιοί. Ένας αριθμός RNA και DNA ιών έχουν σχετισθεί άμεσα με τη πρόκληση όγκων. Οι μηχανισμοί πρόκλησης είναι οι εξής : α) εισαγωγή ιικών ογκογονιδίων στο γενετικό υλικό του ξενιστή β) αλληλεπίδραση ιικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών – σινιάλων του κυττάρου – ξενιστή και γ) έλεγχος της έκφρασης πρωτο-ογκογονιδίων από ιικό υποκινητή.

α) Ογκογονίδια .

Ο όρος ογκογονίδιο προέκυψε κατά τη διάρκεια της έρευνας σε ρετροϊούς για την αναγνώριση παραγόντων που προκαλούν όγκους. Οι ρετροϊοί αποτελούν μία κατηγορία ιών που έχουν ως γενετικό υλικό RNA, το οποίο μεταγράφουν σε DNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Ορισμένοι από αυτούς προκαλούν όγκους σε ζώα, όπως η κότα και το ποντίκι.

Η αναγνώριση των ογκογονιδίων ξεκίνησε από το γονίδιο src του ιού που προκαλεί το σάρκωμα του Rous και το οποίο θεωρήθηκε ως υπεύθυνο για την πρόκληση όγκου από τον συγκεκριμένο ιό. Ογκογονίδια ονομάστηκαν οι περιοχές του γονιδιώματος των ρετροϊών, που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό όγκων (6).



Εικόνα 2. Η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια σε φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να μετατρέψει τα κύτταρα αυτά σε καρκινικά. Αυτό γίνεται διότι τα ογκογονίδια <<διατάσσουν>> τα κύτταρα να δημιουργήσουν πρωτεΐνες που διεγείρουν την ανάπτυξη ή τη διαίρεση {ΕΕΠΟΕ (Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων - Ογκολόγων Ελλάδας). Κλινική Ογκολογία 2007. Γενικό Μέρος (τόμος Α΄)}

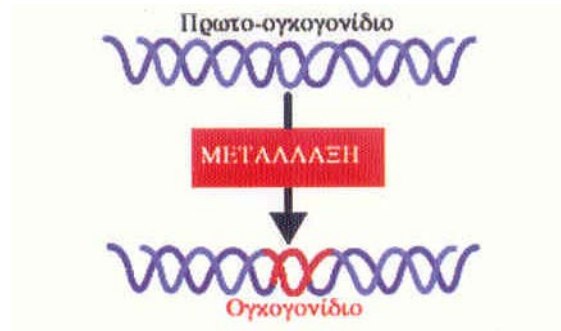
Τα ογκογονίδια είναι όμοια με τα φυσιολογικά γονίδια του κυττάρου που ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια. Η διαφορά τους εστιάζεται στην ιδιότητα που έχουν τα ογκογονίδια, μόλις ενεργοποιηθούν με διάφορους τρόπους, να μετατρέπουν κύτταρα σε καρκινικά (εικόνα 2).

Η φυσιολογική λειτουργία των πρωτο-ογκογονιδίων σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση αυξητικών παραγόντων, υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και ορμονών αλλά και πρωτεϊνών- μεταφορέων ερεθισμάτων από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα και πυρηνικών παραγόντων της μεταγραφής.

Η ενεργοποίησή τους σε ογκογονίδια γίνεται με τους παρακάτω τρόπους :

➔ ενσωμάτωση του πρωτο-ογκογονιδίου στο γενετικό υλικό του ιού με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του πρώτου και την απόκτηση από αυτό ογκογενετικών ικανοτήτων. Τοιουτοτρόπως, τα κύτταρα που προσβάλλονται από τον ιό μεταμορφώνονται. Οι ονομασίες των ιικών ογκογονιδίων καθορίζονται από τον ιό που πρωτοαπομονώθηκαν. Πάραυτα, η πλειοψηφία των καρκίνων στον άνθρωπο δεν προκαλείται από ογκογονίους ιούς.

➔ μέσω μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι εκτεταμένες και να προκαλούν αλλαγή στη δομή των χρωμοσωμάτων (π.χ. διπλασιασμός, εξάλειψη), να αφορούν όλο το γονιδίωμα (τριπλοειδίες) ή να είναι μικρές και να περιλαμβάνουν εξάλειψη, εισαγωγή ή αντικατάσταση βάσης. Συνήθως έχουν επικρατή χαρακτήρα (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Τα ογκογονίδια προκύπτουν από τη μετάλλαξη των πρωτο-ογκογονιδίων και ομοιάζουν με αυτά στο ότι κωδικοποιούν την παραγωγή πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον αναπτυξιακό έλεγχο. {ΕΕΠΟΕ (Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων - Ογκολόγων Ελλάδας). Κλινική Ογκολογία 2007. Γενικό Μέρος (τόμος Α΄)}

Το πρωτο-ογκογονίδιο H-ras-1 είναι το πρώτο γονίδιο, το οποίο απομονώθηκε σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης και βρέθηκε ότι η ενεργοποίησή του οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη, δηλαδή αντικατάσταση της γλυκίνης από βαλίνη στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου.

Στη συνέχεια, ενεργοποιημένο H-ras γονίδιο απομονώθηκε σε καρκίνους του πνεύμονα και του εντέρου όπως επίσης και K-ras ή N-ras γονίδια τα οποία ανήκουν στην ίδια γονιδιακή οικογένεια. Σημειωτέον ότι, όλα τα ενεργοποιημένα H-ras γονίδια περιείχαν σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12,13 και 61, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι οι συγκεκριμένες θέσεις κατέχουν σημαίνοντα ρόλο στη διαδικασία ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης.

Μοριακές μελέτες σε ορισμένες κατηγορίες όγκων έδειξαν ότι, μεταλλαγμένα γονίδια επιδιόρθωσης αποτελούν έναν γενετικό δείκτη, που ονομάζεται μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability). Οι μικροδορυφόροι (microsatellites) συνιστούν βραχείες και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, με πολυμορφισμό μήκους και με όχι απόλυτα γνωστή λειτουργία.

Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα λοιπόν φαίνεται ότι, η συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων έχουν σαν εναρκτήριο μηχανισμό την εμφάνιση γενετικών αλλαγών και οι σωματικές μεταλλάξεις αποτελούν τη βάση ανάπτυξής τους. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι κληρονομούμενες ή/και επίκτητες. Ως εκ τούτου, η καρκινογένεση θεωρείται άμεσα συνδεδεμένη με τη μεταλλαξογένεση.

Η μετάλλαξη, η οποία αποτελεί τον πρώτο κρίκο στην αλυσίδα των γενετικών μεταβολών και που οδηγεί στην ανάπτυξη ειδικών τύπων καρκίνου φαίνεται ότι έχει ειδικότητα ως προς το είδος του γονιδίου και τον τύπο του ιστού(1).

Όμως, μία και μοναδική μετάλλαξη δεν μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση καρκίνου. Εάν αυτή η μετάλλαξη ήταν ικανή να προκαλέσει τη μετατροπή ενός υγιούς κυττάρου σε καρκινικό, δεν θα υπήρχαν βιώσιμοι οργανισμοί. Επίσης, εάν μία μόνο μετάλλαξη ήταν υπεύθυνη, σύμφωνα με ότι συμβαίνει με συγκεκριμένο ρυθμό κατ' έτος, η πιθανότητα να αναπτύξει κανείς καρκίνο σε οποιοδήποτε χρονικό διάστημα θα ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία. Η πραγματικότητα, όμως είναι διαφορετική : η συχνότητα εμφάνισης των περισσότερων τύπων καρκίνου αυξάνεται κατακόρυφα με την ηλικία, γεγονός που συμβαδίζει με την αργή συσσώρευση τυχαίων μεταλλάξεων σε μια κυτταρική γραμμή.

Στις ημέρες μας, η αναγνώριση συγκεκριμένων μεταλλάξεων ως υπεύθυνων για την ανάπτυξη καρκίνου, έχει οδηγήσει στη διαπίστωση ότι ένα μεμονωμένο κακόηθες κύτταρο φέρει συνήθως πολλαπλές μεταλλάξεις. Ζωικά μοντέλα έχουν επίσης επιβεβαιώσει ότι μια και μόνη γενετική αλλαγή είναι ανεπαρκής για την πρόκληση καρκίνου: ποντίκια, στα οποία έχει προκληθεί μόνο μια μετάλλαξη, εμφανίζουν ελάχιστον μόνο ανωμαλίες στην ανάπτυξη των ιστών που ακολουθούνται περιστασιακά από ανάπτυξη καλοήθων όγκων, διασκορπισμένων με τυχαίο τρόπο. Τα περισσότερα, όμως, κύτταρα του μεταλλαγμένου πειραματόζωου παραμένουν μη καρκινικά.

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη καρκίνου προϋποθέτει την δημιουργία μεταλλάξεων σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, πιθανόν περισσότερων από δέκα (7). Παρ' όλα αυτά, ο συνδυασμός των μεταλλαγμένων γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου όπως και η σειρά με την οποία προκύπτουν οι μεταλλάξεις παρουσιάζουν αρκετά σημεία προς περαιτέρω διερεύνηση. Σε ορισμένους καρκίνους, όπως π.χ. του παχέος εντέρου – για τον οποίο θα γίνει ακολούθως εκτενέστερη αναφορά – έχουν προταθεί μοντέλα διαδοχής γενετικών αλλαγών.

➔ ο γονιδιακός πολλαπλασιασμός, ο οποίος οδηγεί σε υπερέκφραση του γονιδίου και απότοκο αύξηση της παραγωγής του πρωτεϊνικού προϊόντος.

Γονιδιακός πολλαπλασιασμός έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου. Το c-myc αποτελεί το πρώτο πρωτο-ογκογονίδιο, το οποίο βρέθηκε να παρουσιάζει τέτοιου τύπου πολλαπλασιασμό σε νεοπλασία ανθρώπου. Αναφέρεται ότι, πολλαπλασιασμός ορισμένων ογκογονιδίων παρατηρείται σε προχωρημένα στάδια κάποιων νεοπλασμάτων και σχετίζεται με κακή πρόγνωση.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ογκογονίδιο HER2/new, το οποίο είναι υπεύθυνο για το 20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού, κωδικοποιώντας την παραγωγή ενός υποδοχέα αυξητικού παράγοντα στην κυτταρική μεμβράνη.

➔ με χρωμοσωμικές μεταθέσεις. Η ανακάλυψη του χρωμοσώματος Φιλαδέλφειας (Ph) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ) και η διαπίστωση ότι είναι αποτέλεσμα μιας μετάθεσης μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22, οδήγησε σε εκτενή μελέτη αυτής της μετάθεσης με τη βοήθεια της μοριακής ανάλυσης. Έτσι, το 1982 τα αποτελέσματα των μελετών οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το ογκογονίδιο ABL, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9q34, μετατίθεται στο χρωμόσωμα 22. Άλλο παράδειγμα αποτελεί το λέμφωμα Burkitt στο οποίο παρατηρούνται οι μεταθέσεις t(8;14)(q24;q32) στο 80 – 85% των περιπτώσεων και οι t(2;8)(p12;q24)

t(8;22)(q24;q11) στο 15 – 20%. Αυτές οι μεταθέσεις φέρνουν σε επαφή το ογκογονίδιο *myc*, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8q24, με τα γονίδια των βαρειών αλύσων των ανοσοσφαιρινών και των κ και λ ελαφρών αλύσων με αποτέλεσμα διαταραχή της λειτουργίας του *myc* ογκογονιδίου.

Στους συμπαγείς όγκους, η κυτταρογενετική ανάλυση είναι δυσχερής, λόγω της πολυπλοκότητας των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και της δυσκολίας εντοπισμού καλής ποιότητας μεταφάσεων για μελέτη. Ταυτόχρονα, η ανεύρεση ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών μεταθέσεων είναι σπανιότερη στους συμπαγείς όγκους σε σύγκριση με τις αιματολογικές νεοπλασίες. Αντίθετα, οι συμπαγείς όγκοι εμφανίζουν κατά κύριο λόγο μερικές ή πλήρεις εξαλείψεις χρωμοσωμάτων, τρισωμίες και μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις. Οι όγκοι οστών και μαλακών μορίων (κατά κύριο λόγο σαρκώματα) χαρακτηρίζονται από την παρουσία ειδικών μεταθέσεων, οι οποίες σε ένα ποσοστό, αποτελούν τη μόνη χρωμοσωμική ανωμαλία.

Σε μοριακό επίπεδο, όλα σχεδόν τα γονίδια - των οποίων η λειτουργία διαταράσσεται από τέτοιου τύπου μεταθέσεις - έχουν καθορισθεί. Κλασσικό παράδειγμα η ειδική χρωμοσωμική μετάθεση t(11;22) (q24;q12) στο σάρκωμα Ewing (1).

Ένα ογκογονίδιο, ανάλογα με το μηχανισμό με τον οποίο προκύπτει από ένα πρωτο-ογκογονίδιο, κωδικοποιεί είτε τη σύνθεση μιας «ογκοπρωτεΐνης» η οποία διαφέρει από τη φυσιολογική είτε την παραγωγή πρωτεϊνικών προϊόντων τα οποία είναι όμοια με τα φυσιολογικά αλλά παράγονται σε ποσότητα πέραν της φυσιολογικής ή σε κύτταρα όπου φυσιολογικά δεν θα επιτελούνταν η παραγωγή τους (8).

β) Ογκοκατασταλτικά γονίδια.

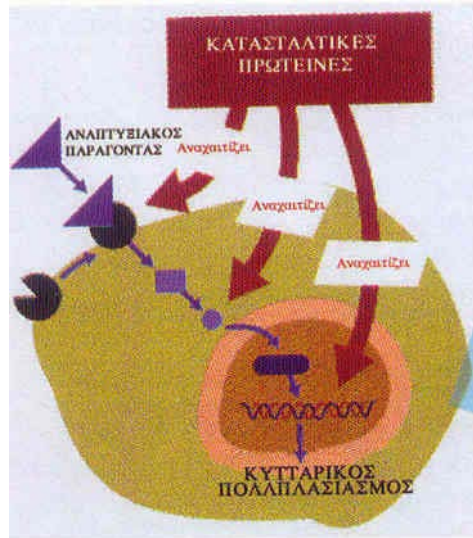
Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν μια ομάδα γονιδίων που εμφανίζει αρνητική – κατασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη όγκων. Αυτό πραγματοποιείται με την κωδικοποίηση της σύνθεσης πρωτεϊνών, οι οποίες με τον ένα ή τον άλλο τρόπο καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επομένως, η λειτουργία τους συνίσταται στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης (εικόνα 4) (1,6,8).

Οι μεταλλάξεις των συγκεκριμένων γονιδίων, συνήθως έχουν υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η μετάλλαξη του ενός αλληλόμορφου γονιδίου επιτρέπει στο άλλο να επιτελεί ανέπαφο την ογκοκατασταλτική λειτουργία του. Το γονίδιο παύει να δρα ογκοκατασταλτικά όταν απενεργοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα του (6).

Κατά καιρούς, από καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων, είχαν προκύψει ενδείξεις για την ύπαρξη γονιδίων τα οποία δύνανται να αναστείλουν την καρκινική ανάπτυξη.

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) είναι εκείνο μέσω του οποίου, για πρώτη φορά, αποδείχθηκε η ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ο Knudson, το 1971, έχοντας ήδη στηριχθεί σε επιδημιολογικά δεδομένα του ρετινοβλαστώματος, διατύπωσε συγκεκριμένη υπόθεση για τη βάση του καρκίνου. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η ανάπτυξη του καρκίνου στηρίζεται στην ύπαρξη δύο αλληλάλληλων γενετικών αλλαγών (two hits hypothesis). Λίγο αργότερα, τη δεκαετία του 1980, καινούργια πειραματικά δεδομένα επιβεβαίωσαν την υπόθεση του Knudson.

Ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία αρκετά συχνά φαίνεται ότι μεταλλάσσονται είναι το TP53 – του οποίου η λειτουργία διαταράσσεται στο 50% των καρκίνων του ανθρώπου - , το γονίδιο του Wilms, το P16 γονίδιο κ.ο.κ.



Εικόνα 4. Οι πρωτεΐνες των κατασταλτικών γονιδίων αναχαιτίζουν κεντρική ανάπτυξη ή διαίρεση. Η απουσία τους επιφέρει ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διαίρεση στο κύτταρο. Τα γονίδια αυτά που ονομάζονται κατασταλτικά (suppressor genes) ενεργούν στο κύτταρο όπως τα φρένα στο αυτοκίνητο (ΕΕΠΟΕ (Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων - Ογκολόγων Ελλάδας). Κλινική Ογκολογία 2007. Γενικό Μέρος (τόμος Α'))

Ενίοτε, μεταλλάξεις πρωτο-ογκογονιδίων μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ορισμένων συνδρόμων. Όλα τα οικογενή καρκινικά σύνδρομα κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Εξάιρεση αποτελούν τα σύνδρομα που οφείλονται σε μειονεκτική επιδιόρθωση βλάβης του DNA, τα οποία κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα π.χ. κάποιοι τύποι του Xeroderma pigmentosum, όπου οι ασθενείς που πάσχουν από αυτό αναπτύσσουν καρκίνους του δέρματος.

Τα οικογενή καρκινικά σύνδρομα, τα οποία κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα, καθορίζονται από τα εξής σημεία - οδηγούς :

- ανάπτυξη νεοπλασίας σε πολύ μικρότερη ηλικία - σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό - για το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου
- παρουσία καρκίνου αμφοτερόπλευρα (π.χ. καρκίνος μαστού) ή πολλαπλών εστιών καρκίνου στο ίδιο όργανο (π.χ. σύγχρονες νεοπλασίες εντέρου)
- παρουσία περισσοτέρων του ενός πρωτοπαθών όγκων σε διάφορα όργανα
- παρουσία συγκεκριμένου τύπου καρκίνου σε άτομα με εξαιρετικά μικρές πιθανότητες προσβολής (π.χ. καρκίνος μαστού σε άνδρες παράλληλα με γυναίκες στην ίδια οικογένεια)
- παρουσία του ίδιου καρκινικού τύπου σε πολλά άτομα της ίδιας οικογένειας
- παρουσία καρκίνου σε συνδυασμό με άλλες διαταραχές π.χ. διανοητική καθυστέρηση κ.ο.κ.

Η πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 2 (MEN2) αποτελεί το πρώτο κληρονομικό ενδοκρινικό νεοπλασματικό σύνδρομο το οποίο μελετήθηκε σε γενετική βάση. Στο MEN2, το πρωτο-ογκογονίδιο RET φέρει μια κληρονομική μετάλλαξη. Το RET βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q11 και κωδικοποιεί την παραγωγή διαμεμβρανικού υποδοχέα τυροσινικής κινάσης. Οι ασθενείς με MEN2 εμφανίζουν μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς, καρκίνο των παραθυρεοειδών και φαιοχρωμοκύττωμα.

Το γονίδιο TP53 λειτουργεί κυρίως ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13 και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελεί παράγοντα μεταγραφής που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και στην απόπτωση. Όταν το φυσιολογικό TP53 σταματήσει να λειτουργεί, τα κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται ενώ η απόπτωση αναστέλλεται.

Η οικογενής ευαισθησία για ανάπτυξη εντερικού καρκίνου χωρίζεται σε υποκατηγορίες ανάλογα με την παρουσία ή μη πολυπόδων στο έντερο. Πρόσφατα έχουν καθορισθεί τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για ορισμένα οικογενή σύνδρομα όπως το σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης, το σύνδρομο Peutz-Jeghers και το σύνδρομο Cowden.

Το APC είναι το υπεύθυνο γονίδιο για την ανάπτυξη οικογενούς εντερικής πολυποδίασης. Εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1987 στο χρωμόσωμα 5. Ανήκει στα ογκοκατασταλτικά γονίδια και κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης 310KDa. Έχει περιγραφεί μια πληθώρα μεταλλάξεων του γονιδίου, οι περισσότερες εκ των οποίων εντοπίζονται στα κωδικόνια 1286-1513. Ειδικότερα, όταν η μετάλλαξη εντοπίζεται πλησίον του κωδικονίου 1300, η απώλεια του αλληλόμορφου γονιδίου συνιστά τη δεύτερη γενετική αλλαγή που οδηγεί στην εκδήλωση σοβαρότερης νόσου. Σε κάποιες μορφές οικογενούς πολυποδίασης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μικρού αριθμού πολυπόδων, οι μεταλλάξεις εστιάζονται στα ακραία γονιδιακά τμήματα. Η απώλεια της έκφρασης του APC γονιδίου δεν συνεπάγεται από μόνη της ανάπτυξη καρκίνου. Αποτελεί, όμως, το πρώτο βήμα για την καρκινογένεση προδιαθέτοντας το κύτταρο να υποστεί κι άλλες γενετικές μεταβολές οι οποίες αθροιζόμενες καταλήγουν στην ανάπτυξη νεοπλασίας. Ο σποραδικός καρκίνος του παχέος εντέρου φαίνεται ότι μοιράζεται τον ίδιο μηχανισμό αφού είναι γνωστό ότι το 80% των εντερικών όγκων φέρει σωματικές μεταλλάξεις στο APC γονίδιο.

Ορισμένες μοριακές μελέτες καρκίνου του εντέρου ανέδειξαν μετάλλαξη στο ογκογονίδιο K- gas και σταδιακή απώλεια γενετικού υλικού των χρωμοσωμάτων 5q, 17p και 18q καθώς και των χρωμοσωμάτων APC, TP53 και Smad4. Άλλου τύπου, επιπρόσθετες αλλοιώσεις που υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα, όπως η μεθυλίωση του DNA, συμβάλλουν στη φαινοτυπική εκδήλωση του καρκίνου. Ο κληρονομικός μη πολυποειδής καρκίνος του εντέρου (HNPCC) ή αλλιώς σύνδρομο Lynch, χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεταλλάξεων σε 5 γονίδια, τα οποία έχουν το ρόλο «φροντιστών» του γενετικού υλικού αφού είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Τα γονίδια αυτά είναι τα : hMSH2,

hMSH6, hMLH1, hPMS1 και hPMS2. Συχνότερα, οι μεταλλάξεις αφορούν τα γονίδια hMLH1 και hMSH2. Στην περίπτωση του συνδρόμου Lynch, το ένα συνήθως από τα 5 γονίδια έχει αδρανοποιηθεί με ταυτόχρονη απώλεια της λειτουργικότητας και του αλληλόμορφου γονιδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επίπτωσης σωματικών μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια και την προοδευτική και πολυσταδιακή εξέλιξη ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό.

Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού, που αφορά το 5 - 10 % των θηλυκού πληθυσμού, εκδηλώνεται είτε ως μεμονωμένη κακοήθης νόσος ή σε συνδυασμό με άλλες νεοπλασίες όπως π.χ. καρκίνο ωοθήκης. Ασθενείς, με καρκίνο μαστού σε νεαρή ηλικία και με καρκίνο ωοθήκης στις ίδιες ή σε άλλα άτομα της οικογένειάς τους εμφανίζουν πιθανόν αλλοιώσεις στο γονίδιο BRCA1. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς παρουσιάζουν μεταλλάξεις και στο γονίδιο TP53 και πάσχουν από καρκίνο αρνητικό σε υποδοχείς οιστρογόνων και εξαιρετικά επιθετικό.

Το γονίδιο BRCA1 εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 17q21 το 1990. Τα άτομα με μετάλλαξη στο συγκεκριμένο γονίδιο μέχρι την ηλικία των 70 ετών έχουν 80% κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και 40% για καρκίνο της ωοθήκης. Το έτερο γονίδιο που σχετίζεται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού είναι το BRCA2, το οποίο εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 13q12-13 το 1994. Ασθενείς με μεταλλάξεις του BRCA2 έχουν 84% κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού μέχρι την ηλικία των 70 ετών, και πολύ μικρό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Σε οικογένειες με οικογενή καρκίνο του μαστού, που αφορά τόσο τα θήλεα όσο και τα αρρένα άτομα, παρατηρούνται συγχρόνως και μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA2.

γ) Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA

Οι μεταλλάξεις σε γονίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, αποτελούν το αίτιο ανάπτυξης ορισμένων συνδρόμων που κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η παρουσία των μεταλλάξεων αυτών, έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου. Το γεγονός ότι, πολλά γονίδια τα οποία σχετίζονται με τα σύνδρομα αυτά, εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, δείχνει ότι έχουν το ρόλο των «γονιδίων φροντιστών».

Παραδείγματα τέτοιων συνδρόμων είναι το σύνδρομο Bloom, η αναιμία Fanconi, το Xeroderma pigmentosum, η αταξία-τηλαγγειεκτασία κ.ο.κ.

Η αναζήτηση, εξακρίβωση και κατανόηση των μοριακών αλλαγών που παρατηρούνται στα κληρονομικά σύνδρομα έχει εξαιρετική σημασία για την ανεύρεση των ασθενών – φορέων αυτών και την περαιτέρω έγκαιρη προληπτική και θεραπευτική τους αντιμετώπιση.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η καρκινογένεση είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από μια σειρά γενετικών μεταβολών, οι οποίες ποικίλλουν από καρκίνο σε καρκίνο ενόσω είναι δυνατόν, σε διαφορετικούς όγκους, να υφίστανται βλάβες ίδια γονίδια. Στις αλλαγές αυτές του γονιδιώματος συμβάλλουν τόσο ογκογονίδια όσο και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Κατά τη

διάρκεια των διαδοχικών φάσεων της ογκογένεσης, τα ογκογονίδια συνδυάζονται με τα μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια με τέτοιο τρόπο ώστε να αναπτυχθεί το σύνολο των ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων (εικόνα 5). Πάραυτα, το ποια από τις αλλαγές δίνει το εναρκτήριο λάκτισμα για την καρκινογένεση καθώς και ο τρόπος διαδοχής των διαφόρων φάσεων της παραμένουν σε αρκετές περιπτώσεις αδιευκρίνιστα (1).



Εικόνα 5. Ο καρκίνος έχει μια πολυσταδιακή πορεία. Προκύπτει, δε, λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων στα ογκογονίδια, στα κατασταλτικά γονίδια και στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Οι συσσωρευμένες βλάβες οδηγούν σε υψηλόβαθμη κακοήθεια και σε μεταστατικό καρκίνο {ΕΕΠΟΕ (Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων - Ογκολόγων Ελλάδας). Κλινική Ογκολογία 2007. Γενικό Μέρος (τόμος Α΄)}

3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο καρκίνος συνιστά ένα εξαιρετικά σημαντικό πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο. Αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου διεθνώς, αμέσως μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Αναφέρεται ότι, το έτος 2000, 10 εκατομμύρια άτομα

εμφάνισαν τη νόσο και 6,2 εκατομμύρια πέθαναν από αυτή διεθνώς (9). Σύμφωνα με τρέχοντα στοιχεία, στις ΗΠΑ, περίπου ένας στους δυο άνδρες και μια στις τρεις γυναίκες θα εμφανίσουν καρκίνο στη διάρκεια της ζωής τους. Παράλληλα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει ανακοινώσει ότι η επίπτωση της νόσου θα αυξηθεί κατά 50% μέχρι το 2020, γεγονός που σηματοδοτεί την εμφάνιση 15 εκατομμυρίων νέων περιπτώσεων ανά έτος.

Η επίπτωση και η θνησιμότητά του καρκίνου αυξάνονται δραματικά με την αύξηση της ηλικίας, τόσο που το 80% των διηθητικών καρκίνων αφορά άτομα ηλικίας άνω των 55 ετών. Απαιτούνται κατά μέσο όρο 10 έτη για να εμφανίσουν τα κύτταρα εκείνες τις γενετικές μεταβολές που είναι συμβατές με τον καρκίνο, και αυτό εξηγεί και την προοδευτική αύξηση της επίπτωσης και της θνησιμότητας μετά την πρώτη δεκαετία της ζωής. Οι καρκίνοι που αναπτύσσονται σε μικρή ηλικία – μικρότερη των 5 ετών - συνήθως οφείλονται σε μεταλλάξεις - κληρονομικές ή πραγματοποιηθείσες κατά την ενδομήτριο ζωή. Το γεγονός ότι, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου μετά την ηλικία των 84 ετών φαίνεται να είναι χαμηλή, οφείλεται πιθανόν στον πλημμελή έλεγχο για διάγνωση νεοπλασίας που γίνεται σε αυτή την ηλικιακή κατηγορία ασθενών.

Η ηλικία αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τον τύπο του καρκίνου που θα αναπτυχθεί αλλά και για τη συχνότητα εμφάνισης αυτού. Για παράδειγμα, μέχρι την ηλικία των 19 ετών, οι πιο συχνοί τύποι θανατηφόρου καρκίνου είναι: η λευχαιμία, ο καρκίνος του ΚΝΣ, των οστών και του ενδοκρινικού συστήματος, με ελάχιστες διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών. Μετά την ηλικία των σαράντα, οι πιο συχνές κακοήθειες είναι: ο καρκίνος των πνευμόνων, του μαστού, του προστάτη και ο ορθοκολικός.

Με βάση αυτές τις εκτιμήσεις της American Cancer Society για το έτος 1999, στον πληθυσμό της Αμερικής, ο καρκίνος των πνευμόνων και των βρόγχων είναι ο πλέον συχνός θανατηφόρος τύπος και για τα δύο φύλα ενώ ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος του μαστού είναι οι κυρίαρχοι τύποι για τους άνδρες και τις γυναίκες αντίστοιχα.

Τόσο η επίπτωση όσο και η θνησιμότητα των διαφόρων μορφών καρκίνου έχουν υποστεί αρκετές μεταβολές στην πάροδο του χρόνου. Για παράδειγμα, όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, η σημαντικότερη αύξηση της θνησιμότητας παρατηρήθηκε από το 1930 μέχρι το 1991, ενώ από το 1992 έως το 1996 σημειώθηκε μείωση. Αντιθέτως για τις γυναίκες τα δεδομένα είναι διαφορετικά: έως το 1960 δεν υπήρξε αύξηση της θνησιμότητας – προφανώς ένεκα καθυστέρησης της έναρξης καπνίσματος.

Επιπρόσθετα, δεν φαίνεται να έχει επέλθει ακόμα μείωση της θνησιμότητας με μικρή εξαίρεση τις νεαρότερες ηλικίες. Οι προαναφερθείσες διαφορές, προφανώς σχετίζονται με τις συνήθειες καπνίσματος των δυο φύλων τη εκάστοτε χρονική περίοδο και δείχνουν περίτρανα τις επιπτώσεις που έχει το κάπνισμα στην υγεία του ανθρώπου.

Δυο αξιοσημείωτες αλλαγές, που έχουν καταγραφεί από το 1930 έως σήμερα, και που χρήζουν αναφοράς, είναι η μείωση των θανάτων από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες και ταυτόχρονα η μείωση της θνησιμότητας του καρκίνου του στομάχου σε αμφότερα τα φύλα. Η μείωση που αφορά τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας οφείλεται στην εισαγωγή και καθιέρωση προληπτικού ελέγχου με το τεστ Παπανικολάου ενώ η αφορώσα τον γαστρικό καρκίνο οφείλεται στην έναρξη ψύξης των τροφών.

Η θνησιμότητα από όλα τα είδη καρκίνου εμφανίζει διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών: στους άνδρες η θνησιμότητα αυξήθηκε από το 1930 έως το 1991 ενώ στο γυναικείο πληθυσμό έχει παραμείνει σταθερή από τη δεκαετία του 1960. Η αιτία αυτών των διαφορών έγκειται στις διαφορετικές αυξομειώσεις που παρουσιάζουν οι διάφοροι τύποι καρκίνου στα δύο φύλα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η επίδραση της κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης ή του φυλετικού παράγοντα στα δεδομένα του καρκίνου έχει μελετηθεί αρκετά, με πλήθος αναλύσεων να επιτελούνται στις ΗΠΑ. Τέτοιες μελέτες έχουν δείξει πως οι Αφροαμερικανοί εμφανίζουν καρκίνο σε υψηλά ποσοστά χωρίς όμως να γίνεται σαφής διάκριση της πτώχειας και των κινδύνων που αυτή συνεπάγεται από τις γενετικές διαφορές της φυλής.

Η θνησιμότητα λόγω καρκίνου είναι επίσης υψηλότερη στους αφροαμερικανούς σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φυλετικές ομάδες από το 1990 μέχρι το 1996, με μόνη εξαίρεση τον καρκίνο του μαστού, όπου τα ποσοστά είναι υψηλότερα στην καυκάσια φυλή. Μελέτη που εκτίμησε την εμφάνιση καρκίνου σε σχέση με τη φυλή και που έλαβε υπόψιν το ρόλο παραγόντων όπως το εισόδημα και τη μόρφωση, και σύγκρινε ασθενείς με παρόμοιο επίπεδο ως προς αυτούς τους παράγοντες, έδειξε ότι οι αφροαμερικανοί έχουν τα ίδια ή και μικρότερα ποσοστά εκδήλωσης καρκίνου. Η προαναφερθείσα μελέτη δείχνει ξεκάθαρα ότι οι διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου στις διάφορες φυλές, έχουν σχέση πιθανόν με κοινωνικο-οικονομικούς παράγοντες, παρά με φυλετικές διαφοροποιήσεις.

Συγκεκριμένα, το χαμηλό κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο φαίνεται ότι συνδέεται με ανεπαρκή παροχή μόρφωσης, ελλιπή ιατρική παρακολούθηση και με παράγοντες επιβαρυντικούς για την υγεία και ευνοϊκούς για την ανάπτυξη καρκίνου όπως η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα, η λανθασμένη διατροφή κ.ο.κ. Γενικότερα, πολλές διαφορές μεταξύ φυλετικών και εθνικών ομάδων που διαμένουν στη ίδια χώρα οφείλονται πιθανότατα σε παράγοντες όπως το κάπνισμα, η διατροφή, η ελλιπής ιατρική παρακολούθηση και η έκθεση σε παράγοντες φλεγμονής όπως οι ιοί ηπατίτιδας Β ή C, το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού κ.α.

Το γεγονός ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες διαδραματίζουν το δικό τους ρόλο στις διαφορές της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου σε διαφορετικούς πληθυσμούς ατόμων καθίσταται εμφανές από ποικίλες επιδημιολογικές μελέτες. Στην Ιαπωνία για παράδειγμα, παρατηρείται χαμηλό ποσοστό καρκίνου του παχέος εντέρου, το οποίο όμως αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό στην πρώτη γενιά Ιαπώνων που έχουν μεταναστεύσει στις ΗΠΑ. Επιπρόσθετα, η θνησιμότητα από καρκίνο του παχέος εντέρου - και σε μικρότερο βαθμό από καρκίνο του μαστού - παρουσίασε αύξηση κατά την χρονική περίοδο 1955 – 1985 στην Ιαπωνία, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με την αλλαγή των διατροφικών συνηθειών του Ιαπωνικού λαού μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο όπου η κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών περιορίστηκε σημαντικά ενώ αυξήθηκε η λήψη κρέατος και λίπους. Οι συγκεκριμένοι διατροφικοί παράγοντες, σε συνδυασμό με έτερους περιβαλλοντικούς, φαίνεται ότι αποτέλεσαν την αιτία των μεταβολών της καρκινικής επίπτωσης και θνησιμότητας σε αυτή τη χώρα. Σύμφωνα με τα στοιχεία του Διεθνούς Γραφείου για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC), που δημοσιεύθηκαν το 2005 και που αποδίδουν τα πιο πρόσφατα δεδομένα για τον καρκίνο παγκοσμίως, το έτος 2002 διεγνώσθησαν 10,9 εκατομμύρια νέες καρκινικές

περιπτώσεις ανά τον κόσμο ενώ 6,7 εκατομμύρια ασθενών κατέληξαν εξ αιτίας της νόσου.

Η συχνότερη μορφή καρκίνου παγκοσμίως εξακολουθεί να είναι ο καρκίνος του πνεύμονα όσον αφορά τον αριθμό νέων περιπτώσεων (1,35 εκατομμύρια), αλλά και θανάτων ετησίως.

Παρά το γεγονός ότι, στις ανεπτυγμένες χώρες, ο ανωτέρω τύπος καρκίνου έχει έρθει δεύτερος σε συχνότητα μετά τον καρκίνο του προστάτη, η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισής του στις αναπτυσσόμενες χώρες – λόγω της ανοδικής επίπτωσης του καπνίσματος – αντισταθμίζει παγκοσμίως τα δεδομένα των ανεπτυγμένων περιοχών. Ο καρκίνος του μαστού έρχεται δεύτερος σε συχνότητα (1,15 εκατομμύρια περιπτώσεις) και στην πέμπτη θέση ως προς τη θνησιμότητα ένεκα της καλύτερης του πρόγνωσης που προσφέρει τη δυνατότητα αποτελεσματικότερης πρόληψης και πιο έγκαιρης διάγνωσης.

Από την άποψη της πρόγνωσης, αποθαρρυντικά δεδομένα υπάρχουν για τον καρκίνο του στομάχου (934000 νέες περιπτώσεις και 700000 θάνατοι) και του ήπατος (626000 νέες περιπτώσεις και 598000 θάνατοι) και αρκετά καλύτερα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (1,02 εκατομμύρια νέα περιστατικά και 529000 θάνατοι).

Γενικότερα, η επίπτωση των διαφόρων μορφών καρκίνου διαφέρει σημαντικά από περιοχή σε περιοχή με τις ανεπτυγμένες χώρες να παρουσιάζουν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σύγκριση με τις αναπτυσσόμενες.

Στην Ευρώπη, τα στοιχεία που δημοσίευσε το IARC για το 2004, δείχνουν ότι ο συχνότερος τύπος καρκίνου είναι του πνεύμονα, με δεύτερο τον καρκίνο του παχέος εντέρου και τρίτο του μαστού.

Στην Ελλάδα, η πρώτη ουσιαστική και επιτυχημένη προσπάθεια συστηματικής στατιστικής καταγραφής στοιχείων σχετικών με τον καρκίνο, ξεκίνησε το 1988, με την ίδρυση του Ελληνικού Αρχείου Νεοπλασιών. Τα πρώτα αποτελέσματα που ανακοινώθηκαν και αφορούσαν τη χρονική περίοδο 1990 – 91 έδειξαν ότι οι συχνότεροι τύποι καρκίνου στον ανδρικό πληθυσμό ήταν: ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, του δέρματος, του παχέος εντέρου, του προστάτη, του στομάχου, του λάρυγγα και τα λεμφώματα. Για τις δε γυναίκες, η συχνότερη μορφή καρκίνου ήταν του μαστού με τον καρκίνο του δέρματος, του παχέος εντέρου, της μήτρας, τα λεμφώματα και τον καρκίνο του θυρεοειδούς να έπονται σε συχνότητα. Ο συχνότερος τύπος καρκίνου στους άνδρες είναι ο καρκίνος του πνεύμονα ακολουθούμενος από τον καρκίνο του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του παχέος εντέρου, του ήπατος, του στομάχου κ.ο.κ. Οι τέσσερις πρώτες αιτίες θανάτου, για το συγκεκριμένο φύλο, είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του προστάτη, του ήπατος και του παχέος εντέρου. Το πιθανό αίτιο για την σχετικά υψηλή θνησιμότητα από τον καρκίνο του προστάτη είναι η καθυστέρηση στη διάγνωση και οι εξ αυτής περιορισμένες δυνατότητες ριζικής θεραπείας.

Στο γυναικείο πληθυσμό, ο καρκίνος του μαστού κρατά τα σκήπτρα όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισής του, και ακολουθούν ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του σώματος της μήτρας, του στομάχου κ.ο.κ. Οι πρώτες αιτίες θανάτου είναι ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του ήπατος.

4. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΩΝ

Το Διεθνές Γραφείο για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) ερευνά συστηματικά γνωστά και πιθανά καρκινογόνα, με τη βοήθεια διεθνών ομάδων επιστημόνων. Στη συνέχεια, με βάση τα στοιχεία τα οποία εξάγει από την έρευνα, πραγματοποιεί την κατάταξή τους σε τέσσερις κατηγορίες που είναι οι ακόλουθες :

1. τάξης Α : ύπαρξη επαρκών αποδείξεων καρκινογένεσης, δηλαδή όταν υπάρχει δεδομένη αιτιολογική σχέση παράγοντα – καρκίνου
2. τάξης Β : όταν υπάρχουν περιορισμένες αποδείξεις καρκινογένεσης, δηλαδή όταν διαπιστώνεται αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου σε σχέση με τον παράγοντα αλλά δεν αποκλείεται η επίδραση παραπλανητικών στοιχείων για την εξαγωγή αυτού του συμπεράσματος
3. τάξης Γ : όταν υπάρχουν ανεπαρκείς αποδείξεις καρκινογένεσης, όταν δηλαδή οι μελέτες που θα οδηγήσουν σε συμπεράσματα καρκινογένεσης υπολείπονται σε ποιότητα και εγκυρότητα ή απουσιάζουν παντελώς στοιχεία
4. τάξης Δ : ανυπαρξία δεδομένων καρκινογένεσης, δηλαδή οι υπάρχουσες μελέτες έκθεσης στον παράγοντα δείχνουν επίμονα απουσία αυξημένου κινδύνου.

Οι πιθανοί παράγοντες, που πιθανόν εμπλέκονται στην αιτιολογία του καρκίνου, διακρίνονται σε επαγγελματικούς, μολυσματικούς, φαρμακευτικούς και σχετιζόμενους με τη διατροφή και τον τρόπο ζωής, αν και δεν υπάρχουν απόλυτα κριτήρια κατάταξης του καθενός σε μία μόνο κατηγορία.

Μεγαλύτερος όγκος πληροφόρησης υπάρχει για τους επαγγελματικούς παράγοντες μιας και εργάτες από διάφορους τομείς απασχόλησης, περιστασιακά, έχουν εκτεθεί σε τέτοιους παράγοντες για άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα. Εντούτοις, αν και η έκθεση σε επαγγελματικά καρκινογόνα έχει ελαττωθεί σημαντικά στις ανεπτυγμένες χώρες, συνεχίζουν να κάνουν την εμφάνισή τους καινούργια καρκινικά περιστατικά, γεγονός που ίσως οφείλεται σε προηγηθείσα έκθεση των ατόμων σε παράγοντες καρκινογένεσης ή στην ύπαρξη άγνωστων καρκινογόνων.

Μέρα με τη μέρα, γίνεται συνεχώς γνωστή η ύπαρξη καινούργιων βιολογικών παραγόντων με τεκμηριωμένη καρκινογόνο δράση, όπως οι ιοί ηπατίτιδας Β ή C και οι αφλατοξίνες για τον καρκίνο του ήπατος. Το κάπνισμα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για διάφορους τύπους καρκίνου σε αντίθεση με το αλκοόλ του οποίου η εμπλοκή είναι σαφώς πιο περιορισμένη.

Το κάπνισμα αποτελεί τη συνήθεια με τις πλέον καταστροφικές συνέπειες για τη δημόσια υγεία. Στις ΗΠΑ, το 1982, ανακοινώθηκε για πρώτη φορά ότι το κάπνισμα αντιπροσωπεύει την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, διαπίστωση που αφορά και τις Ευρωπαϊκές Χώρες. Το κάπνισμα σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα, του λάρυγγα, του οισοφάγου, του στοματοφάρυγγα και με αυξημένη πιθανότητα με τον καρκίνο του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης, του ήπατος, του τραχήλου της μήτρας, των νεφρών, του στομάχου, του ορθοκολικού και ορισμένων τύπων λευχαιμίας. Έχει υπολογισθεί ότι περί το 87% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα προκαλούνται από το κάπνισμα. Στον καπνό περιέχονται περισσότερες από 4000 ουσίες, εκ των οποίων οι 60 τουλάχιστον έχουν καρκινογόνες ιδιότητες. Οι

πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι N-νιτροζαμίνες συνιστούν τις κύριες κατηγορίες καρκινογόνων, η ενεργοποίηση των οποίων μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις σε ορισμένα γονίδια, όπως το p53, και να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Η νικοτίνη αποτελεί το βασικότερο εξαρτησιογόνο συστατικό του καπνού, παρότι δεν συγκαταλέγεται στα καρκινογόνα.

Δεν παρουσιάζουν όλοι οι καπνιστές τον ίδιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου αφού αυτός σχετίζεται με τη συνολική έκθεση στον καπνό, δηλαδή τον αριθμό των τσιγάρων ημερησίως, την ηλικία έναρξης και το σύνολο των ετών του καπνίσματος. Για το λόγο αυτό, ένας μόνο στους δέκα καπνιστές αναπτύσσουν τελικά καρκίνο.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στο DNA των κυττάρων, κάποιες από τις οποίες δεν είναι ανατάξιμες και μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Ορισμένες από αυτές τις βλάβες καταλήγουν ενίοτε σε μεταλλάξεις οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων. Ως εκ τούτου, η ιοντίζουσα ακτινοβολία θεωρείται ως ένας παράγοντας με σαφή καρκινογόνο δράση, γεγονός που έχει ήδη επιβεβαιωθεί από μελέτες. Αντίθετα, τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα, δείχνουν ότι η μη ιοντίζουσα ακτινοβολία – μαγνητικά πεδία, ραδιοσυχνότητες - δεν προδιαθέτει σε ανάπτυξη καρκίνου.

Η αιθανόλη, παρότι δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα καρκινογένεσης, έχει βρεθεί ότι τετραπλασιάζει τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του στοματοφάρυγγα, του λάρυγγα, του οισοφάγου και του ήπατος ενώ όταν συνδυάζεται με το κάπνισμα εμφανίζει ισχυρή συνέργεια για την ανάπτυξη των ανωτέρω καρκίνων με εξαίρεση τον καρκίνο του ήπατος. Πιθανά αίτια είναι οι ελλείψεις σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες που συχνά εμφανίζουν οι αλκοολικοί ή η δράση της αλκοόλης στον επιθηλιακό ιστό, ως τοπικός διαλύτης, που επιτρέπει τη διείσδυση των καρκινογόνων των τροφών και του καπνού εντός των κυττάρων.

Όσον αφορά τους διατροφικούς παράγοντες, σύμφωνα πάντα με υπάρχοντα δεδομένα, τα φρούτα και τα λαχανικά λειτουργούν προστατευτικά για την καρκινογένεση στο παχύ έντερο, τον προστάτη, το ενδομήτριο ή το μαστό, σε αντίθεση με το κόκκινο κρέας και τα λιπαρά που επικρατούν πλέον στο διαιτολόγιο των Δυτικών Χωρών. Πάραυτα, οι σχετικές με τη διατροφή μελέτες, εμφανίζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα λόγω της ποικιλίας των χημικών ουσιών που περιέχονται στις τροφές. Η παχυσαρκία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο των ορμονοεξαρτώμενων, κυρίως, καρκίνων όπως του μαστού, του ενδομητρίου ή του προστάτη. Πιθανή αιτία είναι η παραγωγή οιστρογόνων, από τη μετατροπή της ανδροστενδιόνης των επινεφριδίων σε οιστρόνη, με τη βοήθεια των αρωμασών του λιπώδους ιστού, ο οποίος συνιστά πηγή οιστρογόνων - ιδίως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Τροφές πτωχές σε λιπαρά, όπως οι σπόροι, τα φρούτα, ορισμένοι ξηροί καρποί και τα λαχανικά, έχουν προστατευτική δράση ενάντια του καρκίνου όπως πιθανά και οι φλαβίνες, οι φαινόλες, τα θειϊκά σύμπλοκα και οι φυτικές ίνες μέσω παρέμβασής τους στις ενδοκυττάριας οδούς μεταγωγής του σήματος και της προαγωγής της απόπτωσης. Τα προβιοτικά αποτελούν μία άλλη κατηγορία παραγόντων που μελετώνται επισταμένα για την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η μεγάλη κατανάλωση άλατος θεωρείται παράγοντας κίνδυνου για την ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου σε αντίθεση με κατανάλωση φρούτων και λαχανικών. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να γίνονται

συστάσεις για περιορισμό της κατανάλωσης λίπους και αύξηση της πρόσληψης ινών, αν και δεν υπάρχει, προς το παρόν, σαφής απόδειξη του προληπτικού τους ρόλου στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η χορήγηση βιταμινών, ιχνοστοιχείων ή συμπληρωμάτων διατροφής, σε αυξημένες ποσότητες, δεν έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν από τον καρκίνο.

Οι ορμόνες έχουν σχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνου σε ενδοκρινείς αδένες και ιστούς-στόχους αυτών των ορμονών που μπορεί να έχουν παραχθεί ενδογενώς ή να έχουν χορηγηθεί εξωγενώς. Οι κύριες μορφές καρκίνου, που παρουσιάζουν ορμονική εξάρτηση, είναι ο καρκίνος του μαστού, του ενδομητρίου, των ωθηκών, του τραχήλου της μήτρας, του προστάτη, των όρχεων και του ήπατος. Έχουν, επίσης, εκφρασθεί απόψεις περί της συμμετοχής των οιστρογόνων σε νεοπλάσματα όπως το κακόηθες μελάνωμα, ο καρκίνος του νεφρού, του παχέος εντέρου, του θυρεοειδούς, της χοληδόχου κύστης και του πνεύμονα.

Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία σχετίζεται με τον καρκίνο του δέρματος με αθροιστικό τρόπο, με εξαίρεση το μελάνωμα, όπου σημαντικό ρόλο παίζουν η παρουσία πολλαπλών καλοήθων ή άτυπων σπύλων ή η επαναληπτική εμφάνιση ηλιακών εγκαυμάτων.

Η φυσική δραστηριότητα επιδρά ευεργετικά στην πρόληψη διάφορων τύπων νεοπλασίας όπως π.χ. του παχέος εντέρου, του μαστού ή του προστάτη. Αν και δεν υπάρχει σαφής αιτιολογική συσχέτιση, για την πρόληψη των παραπάνω τύπων καρκίνου, έχει προταθεί η άσκηση 30 – 45 λεπτών 5 φορές την εβδομάδα.

Σε γενικές γραμμές, για την ανάπτυξη νεοπλασιών στον άνθρωπο φαίνεται ότι παίζει βασικό ρόλο η αλληλεπίδραση γενετικών παραγόντων με περιβαλλοντικούς ενώ για μια μειοψηφία καρκίνων υπεύθυνη είναι η παρουσία γονιδίων με μεγάλη διεισδυτικότητα.

Τέλος, ορμονικοί μηχανισμοί, όπως αυτοί που συμμετέχουν στη λειτουργία της αναπαραγωγής, διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη ορισμένων ειδών καρκίνου.

Παραδείγματα τέτοιων παραγόντων είναι η ηλικία εμμηναρχής και πρώτης εγκυμοσύνης για τον καρκίνο του μαστού ή η απουσία τεκνοποίησης για τον καρκίνο του ενδομητρίου.

5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ

Όλοι οι καρκίνοι, καλοήθεις ή κακοήθεις, έχουν τα εξής κοινά χαρακτηριστικά : α) παρέγχυμα, το οποίο αποτελείται από συνεχώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, και β) στηρικτικό υπόστρωμα, που συγκροτείται από συνδετικό ιστό και αιμοφόρα αγγεία. Οι όγκοι διαφέρουν ιστολογικά από τους φυσιολογικούς ιστούς σε ορισμένα χαρακτηριστικά, τα οποία βοηθούν στη διάγνωσή τους. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η απώλεια κυτταρικού προσανατολισμού και συνοχής, η διόγκωση του πυρήνα και η αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας.

Ανάλογα με τη συμπεριφορά την οποία εμφανίζουν, οι όγκοι διακρίνονται σε καλοήθεις και κακοήθεις. Υπάρχουν, πάντως, και όγκοι – όπως των ωοθηκών - με ενδιαμέση συμπεριφορά μεταξύ καλοηθών και κακοηθών, οι οποίοι καλούνται «νεοπλάσματα οριακής βιολογικής συμπεριφοράς» και χρήζουν ακριβούς αξιολόγησης της συμπεριφοράς τους (1).

Η διάκριση των καλοηθών από τους κακοήθεις όγκους γίνεται με βάση την ικανότητα των δευτέρων για διήθηση γειτονικών ιστών και μετάσταση. Τόσο η διήθηση και η μετάσταση, όσο και η καχεξία και καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των θανάτων από καρκίνο.

Η διηθητική διαδικασία περιλαμβάνει εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων από την αρχική τους θέση προς διαφορετικά σημεία και στρώματα του ίδιου ιστού, με αποτέλεσμα την επέκτασή τους σε γειτονικές δομές. Περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια : η βασική μεμβράνη, που χωρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα από τα μεσεγχυματικά καταστρέφεται, και ο καρκινικός όγκος κυττάρων επεκτείνεται στο συνδετικό και το μυϊκό ιστό. Ταυτόχρονα, αναπτύσσεται φλεγμονή, με παρουσία κοκκιοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και μακροφάγων στην καρκινική μάζα ενώ προάγεται και η αγγειογένεση, δηλαδή η δημιουργία νέων τριχοειδών αγγείων και η βελτίωση των ήδη υπάρχοντων, για την επαρκή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών.

Η αγγειογένεση αφορά επίσης και τα λεμφαγγεία.

Με τη σειρά της η μετάσταση, αποτελεί μια διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από δραπέτευση κυττάρων από την αρχική καρκινική εστία και μετανάστευση αυτών – μέσω αίματος ή λέμφου – σε άλλα όργανα , με αποτέλεσμα την ανάπτυξη όγκων σε αυτούς. Ανάλογα με την οδό που ακολουθείται, η αιματογενής μετάσταση οδηγεί σε ανάπτυξη δευτερογενών όγκων σε απομακρυσμένα όργανα, ενώ η λεμφογενής καταλήγει αρχικά σε διήθηση των λεμφαδένων της περιοχής της αρχικής εστίας. Η μετάσταση αποτελεί, επίσης, μια πολυσταδιακή διαδικασία. Ο αριθμός των μεταστάσεων που αναπτύσσονται, είναι μικρότερος από τον αριθμό των κυττάρων που εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία διότι τα καρκινικά κύτταρα βρίσκουν αρκετά εμπόδια στην προσπάθειά τους να εξέλθουν από τα τριχοειδή αγγεία και να εγκατασταθούν και επιβιώσουν στο περιβάλλον ενός «ξένου» ιστού. Μεμονωμένα κύτταρα ή μικρό σύνολο κυττάρων μπορεί να εγκατασταθούν σε ένα «ξένο» ιστό και να επιβιώσουν, χωρίς να πολλαπλασιαστούν, για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι μικρές αυτές εστίες μεταστάσεων, ανιχνεύονται συνήθως με βιοχημικό έλεγχο - μέσω πρωτεϊνών που εκκρίνουν τα καρκινικά κύτταρα - και όχι με απεικονιστικές τεχνικές. Αργότερα, τα κύτταρα αυτά μπορεί, έχοντας προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες, να δώσουν γένεση σε μεγαλύτερες εστίες μεταστάσεων. Μια τέτοιου τύπου εξέλιξη, είναι δυνατόν να συμβεί ακόμη κι αρκετά χρόνια , μετά την εξαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας. Τα όργανα, στα οποία υπάρχει ιδιαίτερη προτίμηση για μετάσταση, είναι εκείνα που βρίθουν τριχοειδών αγγείων, όπως το ήπαρ, οι πνεύμονες και τα οστά (5). Τα κακοήθη νεοπλάσματα ταξινομούνται ανάλογα με την ιστολογική τους προέλευση, την τοπογραφία και τη βιολογική τους συμπεριφορά.

Από ιστογενετική άποψη, οι κύριες κατηγορίες είναι τα νεοπλάσματα από επιθηλιακό ιστό που ονομάζονται καρκινώματα, από μεσεγχυματικό ιστό που καλούνται σαρκώματα, από λεμφικό και αιμοποιητικό ιστό, όπως τα λεμφώματα και οι

λευχαιμίες, από το ΚΝΣ, από τα γεννητικά κύτταρα, από νευροενδοκρινή κύτταρα και από τα μελανοκύτταρα (κακόηθες μελάνωμα).

Η τοπογραφική ταξινόμηση των καρκίνων γίνεται ανά σύστημα και όργανο ανάπτυξης. Τέλος, η βιολογική ταξινόμηση γίνεται με βάση στοιχεία της συμπεριφοράς των νεοπλασμάτων, όπως ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (IBK-grade), η λεμφοκυτταρική αντίδραση, η έκφραση ορμονικών και λοιπών υποδοχέων, ο βαθμός διηθητικής ανάπτυξης και η διήθηση αγγείων, σύμφωνα με την οποία εξάγονται συμπεράσματα για την πιθανότητα μετάστασης ενός όγκου.

Ο IBK αποτελεί έναν τρόπο πρόβλεψης της βιολογικής συμπεριφοράς μιας κακοήθειας, συγκρίνοντας ειδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των καρκινικών ιστών με αντίστοιχα των μη καρκινικών. Αντιπροσωπεύει τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα για τους περισσότερους κακοήθεις όγκους (π.χ. μαστός), σε κάποιους άλλους έπεται της σταδιοποίησης (π.χ. παχύ έντερο) ενώ σε ορισμένα καρκινώματα η βιολογική συμπεριφορά καθορίζεται από τον ιστολογικό τύπο. Ο προσδιορισμός του δεν γίνεται με βάση τα ίδια κριτήρια για το κάθε είδος νεοπλασματος. Μπορεί, ακόμη, να διαφέρει από όργανο σε όργανο για το ίδιο νεόπλασμα. Καθορίζεται κυρίως από το επίπεδο διαφοροποίησης του όγκου, την πυρηνική ατυπία ή και τα δύο. Ο μιτωτικός δείκτης, η ύπαρξη νεκρώσεων, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η αγγειογένεση, η περιεκτικότητα σε DNA, η p53 ογκοπρωτεΐνη και άλλοι μοριακοί δείκτες συμμετέχουν στη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου.

Διαφοροποίηση, είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον βαθμό στον οποίο ένας νεοπλασματικός ιστός μοιάζει ιστολογικά με τον ιστό προέλευσής του. Η παντελής απουσία διαφοροποίησης καλείται αναπλασία και θεωρείται ενδεικτική της κακοήθους εξαλλαγής. Ο βαθμός διαφοροποίησης του καρκίνου έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, διότι σχετίζεται με την επιβίωση και τη σωστή επιλογή θεραπείας των ασθενών. Υπάρχουν διάφορα επίπεδα διαφοροποίησης των όγκων από την υψηλή διαφοροποίηση όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα προσομοιάζουν με τα κύτταρα προέλευσης τους μέχρι τους πλήρως αδιαφοροποίητους όγκους. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα κύτταρα είναι σε τέτοιο βαθμό αδιαφοροποίητα, που είναι εξαιρετικά δύσκολο να καθορισθεί η ιστογενετική τους καταγωγή. Οι καρκίνοι που δεν εμφανίζουν ιστογενετικά γνωρίσματα, ονομάζονται «αναπλαστικοί» ή αλλιώς «ατρακτοκυτταρικοί» από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, είναι υψηλής κακοήθειας και με άσχημη πρόγνωση. Παράλληλα, υπάρχουν ορισμένα καρκινώματα, που περιέχουν κύτταρα που δεν μπορούν να διακριθούν από τα φυσιολογικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο ακανθοκυτταρικός καρκίνος του δέρματος, του οποίου κύτταρα δεν διαφέρουν από τα φυσιολογικά πλακώδη επιθηλιακά. Τα σημαντικά βήματα βελτίωσης των ιστοπαθολογικών τεχνικών διάγνωσης – ηλεκτρονική μικροσκόπηση, ανοσοϊστοχημεία, μοριακές τεχνικές – έχουν, πλέον, ελαχιστοποιήσει τον αριθμό των αταξινόμητων όγκων, βοηθώντας σημαντικά στην εφαρμογή σωστότερων θεραπευτικών επιλογών. Στην περίπτωση των μεταστάσεων, οι πρωτοπαθείς εστίες εντοπίζονται με την ιστολογική ταυτοποίηση της νεοπλασίας. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως, ότι, μόνη η ιστογενετική ταξινόμηση δεν αρκεί πλέον, μιας και, η ίδια νεοπλασία σε διαφορετικό όργανο πιθανόν να χρειαστεί διαφορετική θεραπεία (π.χ. αδενοκαρκίνωμα). Σε κάθε

περίπτωση, η κλινικοπαθολογοανατομική συσχέτιση είναι απαραίτητη για την επίτευξη καλύτερης διάγνωσης.

Η σχέση του βαθμού διαφοροποίησης ενός κακοήθους όγκου με τη βιολογική του συμπεριφορά είναι γνωστή εδώ και τουλάχιστον έναν αιώνα. Η μέθοδος καθορισμού του IBK του Broders, που προέκυψε το 1920, και που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, έχει τέσσερις βαθμίδες (grades) και εφαρμόζεται μέχρι σήμερα. Συγκεκριμένα, στις ημέρες μας, χρησιμοποιείται το τετραβάθμιο σύστημα που έχει προταθεί από τον WHO για όλα τα όργανα, χωρίς διαφοροποίηση της ταξινόμησης ανά όργανο. Σύμφωνα με αυτό το σύστημα, όλοι οι κακοήθεις όγκοι βαθμολογούνται - ανάλογα με το ποσοστό αδιαφοροποίητων κυττάρων που έχουν σε: grade 1 (<26%), grade 2 (26 – 50%), grade 3 (51 – 75%) και grade 4 (>75%). Τα grade 1 ονομάζονται υψηλής ή ανώτερης, τα grade 2 μέσης και τα grade 3 και 4 χαμηλής διαφοροποίησης. Σε ορισμένα νεοπλάσματα, ο υπότυπος είναι αυτός που καθορίζει τη βιολογική τους συμπεριφορά και όχι ο βαθμός διαφοροποίησης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι καρκίνοι του λεμφικού και αιμοποιητικού ιστού, το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος, το σάρκωμα Ewing, τα μη σωληνώδη καρκινώματα του στομάχου κ.ο.κ. Για κάποιες νεοπλασίες έχουν διαμορφωθεί συστήματα καθορισμού του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας, όπως π.χ. για τους καρκίνους του ουροποιογεννητικού, του ΚΝΣ και για τα σαρκώματα (1).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Η μοριακή ιστοπαθολογία, μελετά την παθογένεια και την πρόοδο των διαφόρων νοσημάτων με βάση τις αλλοιώσεις των γονιδίων και των προϊόντων έκφρασής τους. Παλαιότερα, εφαρμόζονταν αποκλειστικά και μόνο στα πολύ καλά οργανωμένα ερευνητικά εργαστήρια. Στις ημέρες μας, η ευρύτερη εφαρμογή της, έχει βοηθήσει σημαντικά όλους τους τομείς της σύγχρονης ιατρικής, στην πληρέστερη και σε βάθος αναζήτηση και κατανόηση πληροφοριών και απαντήσεων σε ουσιώδη ερωτήματα της κλινικοεργαστηριακής Ιατρικής.

Παρότι ο όρος «μοριακή» υποδεικνύει μελέτη σε επίπεδο μορίων, η μοριακή ανάλυση ασχολείται εν γένει με τα νουκλεϊνικά οξέα και ως εκ τούτου και η μοριακή ιστοπαθολογία με τις διαταραχές του DNA ή του RNA με την αρωγή των κατάλληλων τεχνικών.

Η παθολογοανατομική εξέταση των βιοπτικών ή χειρουργικών παρασκευασμάτων γινόταν κατά κανόνα μακροσκοπικά σε πρώτη φάση, και στη συνέχεια ακολουθούσε ο μικροσκοπικός έλεγχος κατόπιν επεξεργασίας, μικροτομής και χρώσης αυτών. Με αυτή τη διαδικασία, οι Παθολογοανατόμοι, συσχετίζαν τις παρατηρήσεις τους ως προς το σχήμα, το χρώμα και τη συνολική αρχιτεκτονική των κυττάρων με τις κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους ώστε να τεθεί η πλέον σωστή διάγνωση για την εκάστοτε νόσο.

Η κλασική ιστοπαθολογία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση και ταξινόμηση των διαφόρων νεοπλασιών. Βασίζεται στην παρατήρηση και καταγραφή αλλοιώσεων του σχήματος των κυττάρων και του πυρήνα καθώς και της μεταξύ τους σχέσης, σε αλλαγές της αρχιτεκτονικής και στην παρουσία κυτταρικών προϊόντων π.χ. βλέννης, γλυκογόνου κ.λ.π. Ο βαθμός, στον οποίο ομοιάζουν κάποια κύτταρα με τα μητρικά τους συνιστά το βαθμό διαφοροποίησης. Μέχρι σήμερα, η πιο διαδεδομένη μέθοδος μοριακής ανάλυσης είναι η ανοσοϊστοχημεία, η μελέτη δηλαδή των πρωτεϊνικών αντιγόνων με τη βοήθεια αντισωμάτων. Παρά την αξιοσημείωτη συμβολή των ανοσοϊστοχημικών μεθόδων στην ορθότερη ταξινόμηση των κακοήθων όγκων, ο τομέας της πρόγνωσης δεν έχει ωφεληθεί το ίδιο από αυτές.

Σύμφωνα με την κλασική ιστοπαθολογική εξέταση, η μορφολογία κυττάρων και ιστών αντανακλά τις αλλαγές που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο. Υφίσταται, όμως, αδυναμία ακριβούς προσδιορισμού αυτών των αλλαγών. Αντίθετα, η μοριακή βιολογία παρέχει τη δυνατότητα άντλησης πληροφοριών για τη λειτουργική κατάσταση τόσο του κυττάρου όσο και των επιμέρους δομών του.

Οι τεχνικές μοριακής ιστοπαθολογίας διακρίνονται σε: μορφολογικές, όπως ο *in situ* υβριδισμός, κλασικές όπως η απομόνωση DNA και RNA ή ο υβριδισμός κατά Southern/Northern, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων όπως ο προσδιορισμός αλληλουχίας, πρωτεομική.

Η **PCR**, αποτελεί μια μέθοδο πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του DNA που είναι εύκολη και γρήγορη. Ο πολλαπλασιασμός επιτελείται με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Κάθε κύκλος έχει τα εξής στάδια:

A) διάσπαση του δίκλωνου DNA

B) υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο

Γ) σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης .

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τον αποχωρισμό των δύο συμπληρωματικών αλύσεων του DNA - που έχει απομονωθεί από το δείγμα - με αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης μεταξύ 92° και 96°C.

Στη συνέχεια, στο β' στάδιο, λαμβάνει χώρα ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA μέσω μείωσης της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 50° – 65°C. Οι εκκινητές αποτελούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, με μήκος 18-30 βάσεις, που δομούνται από διαφορετικές και μη συμπληρωματικές αλληλουχίες ώστε να μην υβριδίζονται τόσο μεταξύ τους όσο και με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.

Η τρίτη φάση της όλης διαδικασίας περιλαμβάνει τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλύσεων του DNA, στους 72°C, με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση του νουκλεϊνικού οξέος με φορά από 5' προς 3' . Η

θερμοανθεκτική πολυμεράση του βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (Taq Polymerase) είναι εκείνη που χρησιμοποιείται κατεξοχήν συνθέτοντας περίπου 2000 νουκλεοτίδια/ min. Η διάρκεια της συνολικής διαδικασίας εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος.

Η PCR αποτελεί μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία που επιτυγχάνει την ανάλυση ακόμη και μικροσκοπικών δειγμάτων ή ελαχίστων κυττάρων. Σε αυτό συμβάλλει η δημιουργία ενός δισεκατομμυρίου αντιγράφων του αρχικού προϊόντος ύστερα από διαδικασία 30 – 40 κύκλων. Το προϊόν ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή σπανίως σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για ακριβή διαχωρισμό βραχέων μορίων DNA. Τα τμήματα του DNA που έχουν κατά βάση αρνητικό φορτίο μετακινούνται προς το θετικό πόλο της ηλεκτροφορητικής συσκευής. Όσο

μεγαλύτερο είναι το μήκος ενός τμήματος DNA, τόσο μικρότερη είναι η ταχύτητα μετακίνησής του λόγω της αντίστασης που προβάλλει το δίκτυο των μορίων της αγαρόζης ενώ η ανάδειξή του γίνεται με τη βοήθεια της φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχο εθίδιο. Αφού ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των κλασμάτων του DNA, το προϊόν της μεθόδου ανιχνεύεται από το μέγεθος του, το οποίο συγκρίνεται με τμήματα μάρτυρος DNA - που έχει γνωστό μήκος - και υποβάλλεται σε ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση (εικόνα 6).

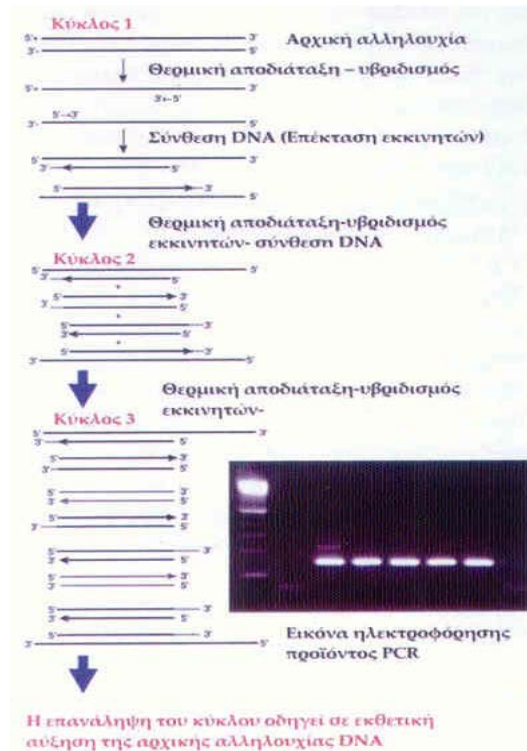
Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής συνίσταται στην επιμόλυνση του εκάστοτε δείγματος από προϊόν της προηγούμενης εξέτασης με ίδιους εκκινητές.

Πολλοί και διάφοροι είναι οι τομείς στους οποίους βρίσκει εφαρμογή η PCR ένεκα της αξιοσημείωτης ευαισθησίας της, όπως η ιατρική, η εγκληματολογία, η παλαιοντολογία κ.ο.κ.

Αναλυτικότερα, οι κύριες κλινικές εφαρμογές της PCR είναι:

- ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση RNA / DNA ιών, όπως HBV, HCV, CMV, HPV...
- ανίχνευση βακτηριδίων, όπως μυκόπλασμα, ουρεόπλασμα, μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης...
- ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδιώματος, π.χ. p53, BRCA1/2...
- προσδιορισμός αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, π.χ. σε μεταμοσχεύσεις

- προσδιορισμός της δραστηριότητας της τελομεράσης
- ανίχνευση μονοκλωνικότητας B και Tα λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 6. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των επαναλαμβανόμενων σταδίων της PCR { ΕΕΠΟΕ (Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων - Ογκολόγων Ελλάδας). Κλινική Ογκολογία 2007. Γενικό Μέρος (τόμος Α')}

Η τεχνική εμφανίζει επιμέρους τύπους, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι:

α) PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR), η οποία επιτρέπει τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων. Σημαντικότερες εφαρμογές της είναι η ανίχνευση χιμαιρικών μεταγράφων από διαμεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων σημαντικών για την εξέλιξη αιματολογικών όγκων ή όγκων συμπαγών οργάνων – που προσφέρει τη δυνατότητα ανεύρεσης υπολειμματικής νόσου και έγκαιρης διάγνωσης υποτροπής – καθώς και η ανίχνευση RNA ιών και ποσοτικού προσδιορισμού του φορτίου τους στα βιολογικά υγρά – που βοηθά στον έλεγχο ανταπόκρισης στη θεραπεία.

β) πολλαπλή PCR (Multiplex PCR), η οποία ανιχνεύει ταυτόχρονα δύο ή περισσότερες αλληλουχίες DNA από ένα δείγμα χωρίς να επιτρέπει επιλεκτικό πολλαπλασιασμό του ενός προϊόντος σε σχέση με το άλλο.

γ) φωλεακή PCR (Nested PCR), η οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον έλεγχο δειγμάτων πτωχών σε ποιότητα , αφού αυξάνει τόσο την ευαισθησία όσο και την ειδικότητα της αντίδρασης.

δ) ποσοτική PCR (Quantitative PCR), η οποία περιλαμβάνει παράλληλο πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου με γνωστή αλληλουχία αναφοράς και στοχεύει στον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων ιών (ικό φορτίο) συμβάλλοντας στην αξιολόγηση της πρόγνωσης και της θεραπευτικής ανταπόκρισης των διαφόρων λοιμώξεων.

Ε) PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR), στην οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα μόρια, που επιτρέπουν την άμεση παρατήρηση του προϊόντος καθόλη τη διάρκεια της σύνθεσής του ώστε να μην απαιτείται περαιτέρω ανάλυση αυτού, π.χ. με ηλεκτροφόρηση.

Παρότι δαπανηρή, η PCR πραγματικού χρόνου χαρακτηρίζεται από αυξημένη ταχύτητα αντίδρασης και ευαισθησία ενώ προσφέρει και τη δυνατότητα πραγματοποίησης ποσοτικών προσδιορισμών (1).

ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. ΟΡΙΣΜΟΙ

Οι <<βιολογικοί δείκτες>> αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία ουσιών που είναι ενδεικτικές ορισμένων βιολογικών καταστάσεων. Χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα αντικειμενικής μέτρησης και αξιολόγησής τους ως δείκτες φυσιολογικών ή παθολογικών διεργασιών και ανταποκρίσεων σε θεραπευτικές αγωγές (10).

Ως <<καρκινικός δείκτης>> ορίζεται κάθε βιολογικό μόριο το οποίο παράγεται είτε απ' ευθείας από κακοήθη κύτταρα, είτε από καλοήθη κύτταρα ως απάντηση σε παρουσία κακοήθους εξεργασίας, και το οποίο εκφράζεται σε άλλοτε άλλο χρόνο και ποσότητα (1).

Πρόκειται, κατά κύριο λόγο, για πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες αλλά μπορεί ακόμη να είναι φωσφολιπίδια και μόρια DNA ή RNA τα οποία είτε παράγονται από τον όγκο αυτό καθαυτό ή από τον οργανισμό ως απάντηση στην παρουσία καρκίνου σε αυτόν. Η ανίχνευση των καρκινικών δεικτών γίνεται σε ιστό ή κύτταρα ενός οργάνου, σε κύτταρα διάσπαρτα ή προερχόμενα από απόξεση και τέλος σε εκκρίσεις και στα διάφορα βιολογικά υγρά όπως ο ορρός, το πλάσμα, τα ούρα, η σίελος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (11).

Στερούνται, πάντως, τόσο ευαισθησίας όσο και ειδικότητας στη διαδικασία ταυτοποίησης κακοήθων όγκων και αυτό οφείλεται σε δύο πιθανούς παράγοντες: α) στην ανεύρεσή τους σε φυσιολογικά σωματικά υγρά, όπως ο ορρός, το γάλα, η τραχηλική βλέννη κ.ο.κ. και β) στο γεγονός ότι αύξηση των επιπέδων τους παρατηρείται και σε μη καρκινικές καταστάσεις, όπως π.χ. σε ασκτικές συλλογές. Ιδιαίτερη σημασία για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ καλοήθους και κακοήθους αύξησης των επιπέδων των δεικτών καρκίνου έχει ο τρόπος ανόδου των τιμών: η πρόσκαιρη αύξηση συνδέεται με καλοήθεις καταστάσεις ενώ η σταθερή αύξηση προσανατολίζει σε κακοήθη νοσήματα.

2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης Bence – Jones στο πολλαπλό μυέλωμα, το έτος 1848, άνοιξε στην ουσία την αυλαία για τη μελέτη των νεοπλασματικών δεικτών. Στη συνέχεια, ξεχωριστό σταθμό απετέλεσε ο προσδιορισμός της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) - του πρώτου, ουσιαστικά, σύγχρονου καρκινικού δείκτη - από τους Ascheim και Zondek, και η συσχέτισή της με τους τροφοβλαστικούς όγκους στον άνθρωπο. (1) Ο ανωτέρω προσδιορισμός πυροδότησε γρήγορα υψηλές προσδοκίες για μια πιθανή μελλοντική δυνατότητα ανίχνευσης όλων των μορφών καρκίνου με μια απλή εξέταση αίματος, οι οποίες ενδυναμώθηκαν το 1965, με την ανεύρεση του καρκινοεμβρικού αντιγόνου (CEA) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του εντέρου. (12)

Σήμερα πάντως, είναι γνωστό ότι, ο μόνος καρκινικός δείκτης που χρησιμοποιείται - προς το παρόν τουλάχιστον - για μαζικό προληπτικό πληθυσμιακό έλεγχο, από τις αρχές του '90, είναι το ειδικό αντιγόνο του προστάτη (PSA), το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία αλλά σχετικά χαμηλή ειδικότητα, λόγος για τον οποίο τα περισσότερα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν και υποχρεωτική βιοψία προστάτη. Από το 1928 - που αποτελεί το έτος ανακάλυψης της hCG- μέχρι τις ημέρες μας, έχει προκύψει ένα πλήθος συσχετίσεων πρωτεϊνικών μορίων με διάφορα κακοήθη νοσήματα.

Βάση για τέτοιου τύπου συσχετίσεις απετέλεσε η κατανόηση της διαδικασίας μετασχηματισμού ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια εξαλλαγής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, παρατηρείται ποσοτική ή ποιοτική μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων του με αποτέλεσμα το κύτταρο να χάνει την εξειδίκευσή του σε σχέση με τον ιστό προέλευσής του και να εμφανίζει χαρακτηριστικά εμβρυϊκών κυττάρων που έχουν χαμηλή διαφοροποίηση. Με αυτόν τον τρόπο, το νέο, <<χαμηλής διαφοροποίησης>> κύτταρο συνθέτει πλέον εμβρυϊκού τύπου πρωτεΐνες οι οποίες δεν ανευρίσκονται σε ενήλικες φυσιολογικά.

Παράλληλα με τις προαναφερθείσες διαδικασίες, κατά τη διάρκεια της εξαλλαγής, παρατηρείται απώλεια του ελέγχου της κυτταρικής αύξησης και απόκτηση διηθητικής και μεταστατικής ικανότητας.

Συγκεντρωτικά, η διαδικασία κακοήθους εξαλλαγής ενός φυσιολογικού κυττάρου περιλαμβάνει :

α) ανάπτυξη γενετικών μεταβολών στο DNA και στο RNA των κυττάρων όπως π.χ. πολλαπλασιασμός ογκογονιδίων, μεταβολές του μικροδορυφορικού DNA, μεταθέσεις χρωμοσωμάτων, μεταλλάξεις στο DNA των μιτοχονδρίων, προσθήκη DNA καρκινογόνων ιών στο γονιδίωμα κ.ο.κ.

β) μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων, με αντίκτυπο στην παραγωγή ενζύμων, ορμονών, υποδοχέων, πρωτεϊνών ή προϊόντων ογκογονιδίων.

Μέχρι τις αρχές του 1980, η ταυτοποίηση ορολογικών δεικτών σε κακοήθεις όγκους γινόταν μόνο σε συμβατικά εργαστήρια χημείας. Έκτοτε, η όλη διαδικασία στηρίζεται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι καθορίζουν τόσο την εμφάνιση όσο και τα επίπεδα ενός δείκτη στο αίμα είναι οι παρακάτω:

- ποσότητα καρκινικών κυττάρων τα οποία παράγουν το συγκεκριμένο δείκτη.

Οι καρκινικοί όγκοι αποτελούνται συνήθως από υποπληθυσμούς κυττάρων, με διαφορετικά μεταξύ τους χαρακτηριστικά. Ως εκ τούτου, η χρήση ενός μόνο δείκτη για έλεγχο πχ ανταπόκρισης μιας κακοήθειας σε θεραπεία, πιθανόν να μην είναι ενδεικτική του θεραπευτικού αποτελέσματος και για αυτό το λόγο προτείνεται η επιλογή δύο τουλάχιστον ή και περισσότερων νεοπλασματικών δεικτών.

Σε κάθε περίπτωση προσδιορισμού ενός καρκινικού δείκτη θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν δύο παράμετροι: ο χρόνος ημίσειας ζωής του δείκτη ($t_{1/2}$) και ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων του όγκου. Για τη μεν πρώτη παράμετρο, σημασία έχει το μέγεθος του μορίου του δείκτη, τα βιοχημικά του χαρακτηριστικά, το μεταβολικό του προφίλ καθώς και οι μεταβολές στην έκφρασή του. Η δε δεύτερη παράμετρος προσδιορίζεται με τη βοήθεια του ενζύμου κινάση της θυμιδίνης.

- ρυθμός με τον οποίο παράγεται ο δείκτης από τα κύτταρα.
- δυνατότητα εντόπισης του δείκτη στα κύτταρα.

Τόσο τα αντιγόνα επιφανείας της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και τα μόρια τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα απελευθερώνονται πιο εύκολα στον εξωκυττάριο χώρο και στα διάφορα βιολογικά υγρά σε σύγκριση με τα μόρια που βρίσκονται συνδεδεμένα με ενδοκυττάρια συστατικά, για την αποδέσμευση των οποίων απαιτείται η νέκρωση των κυττάρων.

- μεταβολές στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης
- δυνατότητα του δείκτη να διαπερνά την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ή τη βασική μεμβράνη, που αμφότερες συνιστούν φραγμό στη διασπορά των δεικτών από τον τόπο παραγωγής τους.

Στην περίπτωση ενός καλοήθους όγκου, η βασική μεμβράνη είναι ακέραιη και ο δείκτης δεν περνά στην κυκλοφορία με συνέπεια χαμηλά επίπεδα αυτού στο αίμα. Όταν, όμως, πρόκειται για έναν κακοήθη όγκο, η βασική μεμβράνη χάνει τη συνέχειά της με επακόλουθη άνοδο των επιπέδων του/ων δείκτη/ών στον ορρό.

- ο βαθμός αγγειοβρίθειας του ιστού που βρίσκεται ο όγκος.

Για παράδειγμα η παρουσία μεταστάσεων στο ήπαρ χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη αύξηση των Ca δεικτών σε σχέση με τις μεταστάσεις σε άλλα όργανα.

- το μεταβολικό προφίλ και ο τρόπος/ρυθμός απομάκρυνσης του δείκτη από την κυκλοφορία του αίματος.

Σε περιπτώσεις ηπατικής ή νεφρικής δυσλειτουργίας ή σε χολόσταση, τα επίπεδα του δείκτη στον οργανισμό αυξάνουν με δυσανάλογο τρόπο.

- ο βαθμός νέκρωσης του καρκινικού ιστού.

Σε νεοπλάσματα με μεγάλες ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις δεικτών, μια κυτταρόλυση μπορεί να προκαλέσει εκσεσημασμένη αύξηση των επιπέδων του Ca δείκτη παρά το μικρό μέγεθος του όγκου. Νέκρωση καρκινικού ιστού μπορεί να συμβεί μετά από θεραπεία ή σε περιπτώσεις αυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού.

- το βιολογικό προφίλ του κάθε ασθενούς.

Κάθε παράγοντας που συνδέεται με το φύλο, την ηλικία, φυλετικά χαρακτηριστικά, γενετικά ή κληρονομικά δεδομένα, τρόπο διαβίωσης και διατροφής κ.ο.κ. του ασθενούς μπορεί να έχει επιρροή και στη συγκέντρωση των καρκινικών δεικτών.

3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Στην κλινική πράξη, οι καρκινικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες :

3Α) Ουκοεμβρυϊκά αντιγόνα .

Τέτοια είναι το CEA, AFP, CA 19-9, CA 125, CA 50, CA 15-3 ή το TPA.

Παρότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διενέργεια προληπτικών ελέγχων - λόγω της χαμηλής ειδικότητας που εμφανίζουν - είναι χρήσιμα σε περιπτώσεις σταδιακής αύξησης ή ιδιαίτερας υψηλών τιμών των επιπέδων τους που θέτει την υποψία κακοήθειας ή υποτροπής αυτής μετά από θεραπεία.

3B) Δείκτες διαφοροποίησης.

Εδώ ανήκουν τα ACP, PSA, HCG, NSE, SCC, 5-HIIA, sr IL-2, κατεχολαμίνες ή η καλσιτονίνη. Και αυτοί οι δείκτες – όπως και οι προηγούμενοι – δεν τυγχάνουν εφαρμογής για προληπτικό έλεγχο, αλλά χρησιμοποιούνται συχνά για την αναγνώριση της εντόπισης της πρωτοπαθούς εστίας ενός καρκίνου καθώς και για προγνωστικούς σκοπούς.

3Γ) Δείκτες ρυθμού ανακύκλωσης των κυττάρων.

Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι είναι τα ένζυμα LDH, PLAP,GT II, το σιαλικό οξύ, η φιβρονεκτίνη κλπ. Με αυτούς τους δείκτες επιτυγχάνεται η εκτίμηση της μάζας ενός καρκίνου και η παρακολούθηση ασθενών με εκτεταμένη νόσο.

3Δ) Δείκτες τραυματισμού οργάνων / απάντησης ξενιστού.

Τέτοιοι είναι τα ένζυμα ALP, LDH, γGT αλλά και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης όπως η CRP, η φερριτίνη, η απτοσφαιρίνη, η β2-μικροσφαιρίνη κ.ο.κ. Αύξηση αυτών των δεικτών παρατηρείται σε προχωρημένες κακοήθειες και σε απουσία άλλων αιτιών αυξήσεώς τους.

Αν και δεν είναι λίγοι οι δείκτες που ταυτοποιήθηκαν σε κακοήθεις όγκους, ένας μικρός μόνο αριθμός χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς λόγους ή για παρακολούθηση ασθενών. Ως εκ τούτου, αναμένεται με μεγάλο ενδιαφέρον η ανακάλυψη νέων δεικτών καρκίνου οι οποίοι να έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα και να τύχουν ευρύτερης εφαρμογής (1).

Για να κριθεί ιδανικός ένας Ca δείκτης θα πρέπει να πληρεί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- να παράγεται εξειδικευμένα από τον προ-κακοήθη/κακοήθη ιστό σε αρχικά στάδια της νόσου
- να παράγεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα σε όλους τους ασθενείς με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου
- να εκφράζεται με οργανο-ειδικό τρόπο
- να είναι ανιχνεύσιμος σε εύκολα προσβάσιμους ιστούς ή βιολογικά υγρά
- τα επίπεδά του να σχετίζονται με το μέγεθος του όγκου ή τη βιολογική συμπεριφορά και την εξέλιξη της νόσου
- να έχει σχετικά μικρό χρόνο ημίσειας ζωής
- να διαθέτει υψηλή τυποποιημένη επαναληψιμότητα και τεκμηριωμένη αντικειμενική και ποσοτική μέθοδο προσδιορισμού του (11).

Η χρησιμότητα των δεικτών μπορεί να είναι εξαιρετικά σημαντική αφού είναι γνωστό ότι η αύξηση των επιπέδων ενός δείκτη στον ορρό του αίματος είναι δυνατόν να προηγείται 3 – 8 μήνες, κατά μέσο όρο, της απεικονιστικής διάγνωσης μιας υποτροπής. Η βιολογική συμπεριφορά του κάθε τύπου καρκίνου είναι εξαιρετικά ειδική ενώ ο κάθε ασθενής έχει έναν δικό του <<προσωπικό>> ρυθμό παραγωγής καρκινικού δείκτη. Αυτό σημαίνει ότι για τον εκάστοτε ασθενή υπάρχει ένα εξατομικευμένο βασικό επίπεδο τιμών (baseline level) για έκαστο καρκινικό δείκτη, το οποίο συχνά δεν είναι γνωστό εκ των προτέρων και ποικίλλει από το καθορισμένο για τους υγιείς ανώτατο όριο τιμών.

Έτσι, η μελέτη των μεταβολών των επιπέδων ενός δείκτη θα πρέπει να γίνεται εξατομικευμένα για συγκεκριμένο πάντα ασθενή.

Το βασικό κριτήριο επιλογής ενός νεοπλασματικού δείκτη για την εφαρμογή του στην κλινική πράξη είναι οι επιμέρους εξειδικευμένες ιδιότητες που αυτός εμφανίζει. Αυτές τον καθιστούν εργαλείο κατάλληλο για τη διαφορική διάγνωση νόσων ή για τον καθορισμό του κινδύνου ανάπτυξης μιας κακοήθειας ή για την πρόβλεψη της πρόγνωσης και της θεραπευτικής ανταπόκρισης ή για την ανίχνευση πρώιμης υποτροπής ή για την παρακολούθηση της πορείας ενός μεταστατικού νοσήματος ή τέλος, για τη διενέργεια μαζικών προληπτικών ελέγχων του πληθυσμού.

Ένας ιδανικός διαγνωστικός δείκτης πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και να μην επηρεάζεται από άλλες καλοήθεις νόσους.

Ο ιδανικός δείκτης πρόβλεψης οφείλει να δείχνει με ακρίβεια τις πιθανότητες ανταπόκρισης στη θεραπεία ενώ ο ιδανικός δείκτης πρόγνωσης θα πρέπει να βοηθά τον θεράποντα στη εκτίμηση του κινδύνου υπότροπής της κακοήθους νόσου και της πιθανότητας θανάτου εξαιτίας αυτής, ανεξαρτήτως θεραπείας.

Στην κλινική πράξη, χαρακτηριστικό παράδειγμα προγνωστικού Ca δείκτη αποτελεί το σύστημα ενεργοποίησης του urokinase-type plasminogen (uPA) και ο plasminogen-activator inhibitor type-1 (PAI-1) στον καρκίνο του μαστού. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες σχετίζονται με τη διηθητική ικανότητα και τοιουτοτρόπως αποτελούν τους πλέον υποσχόμενους δείκτες αυτής της κατηγορίας.

Παράδειγμα δείκτη πρόβλεψης αποτελεί ο προσδιορισμός των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης στον καρκίνο του μαστού.

Οι ιδανικοί δείκτες παρακολούθησης πρέπει να ανιχνεύουν την υποτροπή ή την παραμένουσα νόσο και η αξιοπιστία τους ελέγχεται κατά την διάρκεια της παρακολούθησης ασθενών που έλαβαν ή όχι αγωγή. Τα καλύτερα παραδείγματα αυτής της κατηγορίας δεικτών είναι η alpha-fetoprotein (αFP) και η beta chorionic gonadotropin κατά την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο των όρχεων, το CA-125 για τον καρκίνο των ωοθηκών και τα CEA και CA 19-9 για κακοήθειες του πεπτικού σωλήνα μετά τη θεραπεία α' γραμμής.

Δεν είναι λίγοι οι νεοπλασματικοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς ή για παρακολούθηση ασθενών με κακοήθειες, κυρίως τα τελευταία 20 χρόνια. Η American Society of Clinical Oncology πρότεινε το 1996 ένα σύστημα αξιολόγησης των Ca δεικτών, το Tumor Marker Utility Grading System (TMUGS), το οποίο ήδη τυγχάνει ευρείας χρήσης στον τομέα των κλινικών μελετών.

Εν γένει, η χρησιμότητα των νεοπλασματικών δεικτών συνδέεται με τη δυνατότητα τους να συμβάλλουν στη βελτίωση της έκβασης ή της ποιότητας ζωής των καρκινοπαθών και στη μείωση του κόστους νοσηλείας και θεραπείας αυτών (1).

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

1. ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ – ΓΕΝΙΚΑ

Ο εντερικός σωλήνας αποτελείται από το λεπτό και το παχύ έντερο.

Το παχύ έντερο αποτελεί το τελικό τμήμα του πεπτικού σωλήνα, με σωληνώδη εμφάνιση, και μήκος που προσεγγίζει τα 30 – 40 cm κατά τη γέννηση και φθάνει το 1 - 1,5 m περίπου στον ενήλικα.

Οι κύριες λειτουργίες του είναι η επαναρρόφηση ύδατος και ηλεκτρολυτών από τα κόπρανα και η περιφερική προώθηση των σταδιακά όλο και στερεοτέρων κοπρανωδών μαζών στο ορθό προς αποβολή από τον οργανισμό.

Αποτελείται από το τυφλό – με τη μεγαλύτερη διάμετρο – το κόλο (ανιόν, εγκάρσιο, κατιόν, σιγμοειδές) και το ορθό. Καλύπτεται από περιτόναιο, με εξαίρεση το άπω τμήμα του, δηλαδή το ορθό.

Ιστολογικά, το τοίχωμά του συντίθεται από τέσσερις χιτώνες : το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, το μυϊκό και τον ορογόνο.

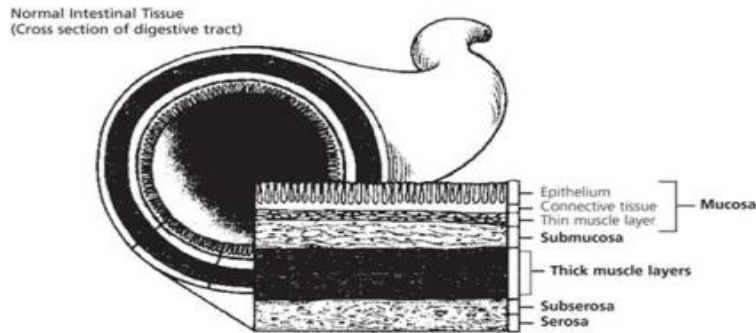
Ο βλεννογόνος περιέχει κατηγορίες κύτταρων τα οποία συμβάλλουν αποφασιστικά στις δύο βασικές λειτουργίες του παχέος εντέρου, όπως η επαναρρόφηση νερού και η λίπανση των κοπράνων για διευκόλυνση της προώθησής τους. Τέτοια κύτταρα είναι τα απορροφητικά και τα βλεννο-εκκριτικά καλυκοειδή. Αυτά βρίσκονται διατεταγμένα σε σωληνώδεις αδένες ή κρύπτες, που εκτείνονται μέχρι τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα. Με τη διάβαση των κοπράνων κατά μήκος του εντερικού αυλού και την προσδευτική αφυδάτωσή τους, η παραγωγή βλέννης καθίσταται όλο και πιο σημαντική για την προστασία του βλεννογόνου από τραυματισμούς. Τα καλυκοειδή κύτταρα βρίσκονται κυρίως στη βάση των αδένων, ενώ η ενδοαυλική επιφάνεια καλύπτεται σχεδόν εξ ολοκλήρου από κυλινδρικά απορροφητικά κύτταρα. Στην περιοχή του επιθηλίου μπορεί κανείς να δει και ενδο-επιθηλιακά T – λεμφοκύτταρα. Πολυδύναμα προγονικά κύτταρα στη βάση των αδένων αντικαθιστούν συνεχώς τα επιθηλιακά. Το χόριο γεμίζει τα κενά μεταξύ των αδένων και περιέχει άφθονα αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία στα οποία γίνεται παθητική διάχυση νερού. Περιέχει, επίσης, κολλαγόνο αλλά και λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, τα οποία αποτελούν μέρος του μηχανισμού άμυνας έναντι των παθογόνων παραγόντων ομού μετά των ενδο-επιθηλιακών λεμφοκυττάρων και των λεμφικών αθροίσεων, οι οποίες είναι μικρότερες από τις πλάκες του Peyer , που εδράζονται στο χόριο και στον υποβλεννογόνο χιτώνα. Η βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα είναι ιδιαιτέρως σημαντική αφού οι ρυθμικές συσπάσεις της εμποδίζουν την απόφραξη των αδένων και επαυξάνουν την εξώθηση της βλέννης. Ο μυϊκός χιτώνας είναι αρκούντως παχύς και ισχυρός, αποτελείται από την έσω κυκλοτερή και την έξω επιμήκη στιβάδα, με την τελευταία να σχηματίζει – με εξαίρεση το ορθό – επιμήκεις πτυχές, τις κολικές ταινίες (εικόνα 7).

Στο παχύ έντερο διαβιεί ένας μεγάλος αριθμός μικροβίων, τα οποία αποδομούν περαιτέρω τα τροφικά υπολείμματα, ενώ μικρές ποσότητες εντεροδιαλυτών βιταμινών,

που προέρχονται από τη βακτηριδιακή δραστηριότητα απορροφώνται από το βλεννογόνο.

Τα παχύ έντερο συνιστά τη θέση ανάπτυξης των περισσότερων πρωτοπαθών νεοπλασιών από οποιοδήποτε άλλο όργανο του σώματος.

Ο ορθοκολικός καρκίνος (ΚΠΕ) κατατάσσεται στους κυρίαρχους τύπους καρκίνου στις βιομηχανοποιημένες, Δυτικού τύπου, κοινωνίες.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των χιτώνων του εντερικού τοιχώματος

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μία από τις βασικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας από καρκίνο στην Ευρώπη, τη Βόρειο Αμερική και σε άλλες περιοχές με παρεμφερείς τρόπους ζωής και διατροφικές συνήθειες.

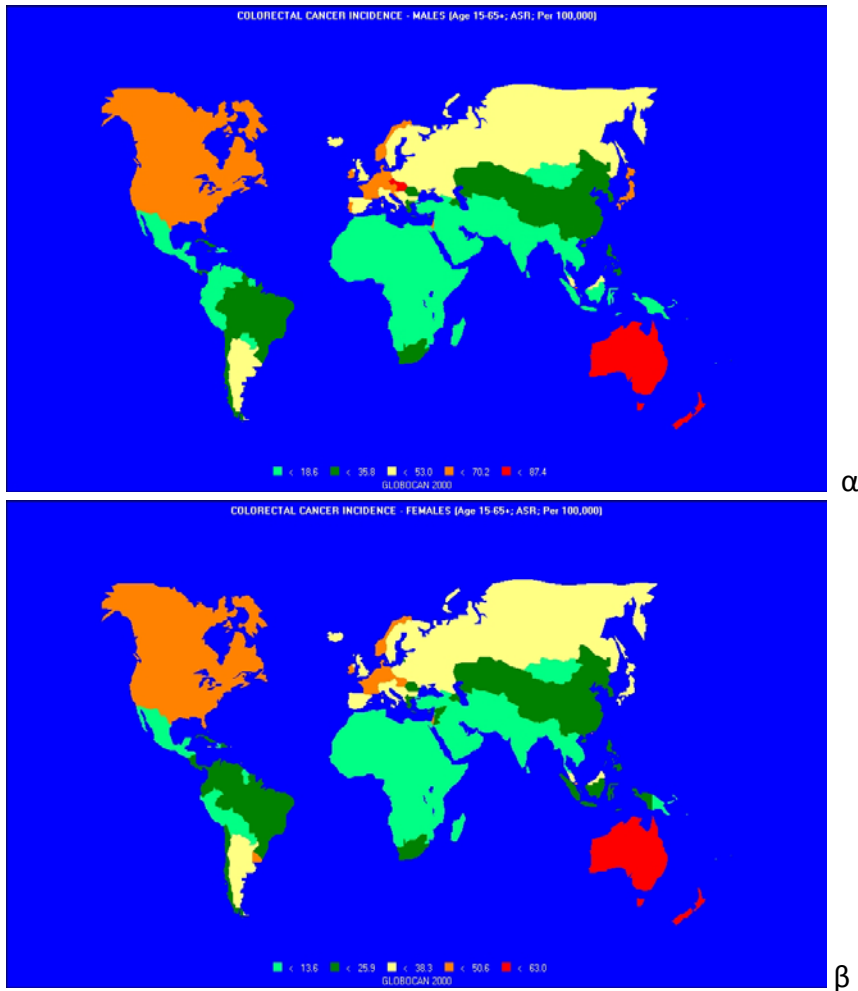
Είναι ο τέταρτος, σε συχνότητα εμφάνισης, καρκίνος μετά τον καρκίνο του μαστού, των πνευμόνων και του προστάτη (13).

Προσβάλλει ετησίως : 1.000.000 άτομα σε παγκόσμιο επίπεδο, 250.000 Ευρωπαίους και 150.000 περίπου Αμερικανούς - εκ των οποίων το ένα τρίτο πεθαίνει από τη νόσο (14).

Η επίπτωσή του δεν φαίνεται να παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, με εξαίρεση τον καρκίνο του ορθού που φαίνεται να είναι πιο συχνός στους άνδρες.

Αντιπροσωπεύει, παγκοσμίως, τον τέταρτο συχνότερο καρκίνο στους άνδρες και τον τρίτο συχνότερο στις γυναίκες.

Τόσο η επίπτωση όσο και η θνησιμότητά του είναι υψηλότερες στη μαύρη σε σχέση με τη λευκή φυλή.



Εικόνα 8. Παγκόσμια επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε α. άνδρες ηλικίας 15-65 ετών β. γυναίκες ηλικίας 15-65 ετών (Globoscan 2000)

Η περιγραφική επιδημιολογία, η οποία περιλαμβάνει και τη μελέτη των χρονικών τάσεων στην εντόπιση του καρκίνου, έχει δείξει ότι, για αμφότερα τα φύλα, έχουν αυξηθεί οι περιπτώσεις καρκίνου στο δεξιό ήμισυ (τυφλό, ανιόν) και στο σιγμοειδές κόλο ενόσω ταυτόχρονα έχουν ελαττωθεί οι νεοπλασματικές βλάβες στο ορθό. Οι μεταβολές αυτές στην εντόπιση του καρκίνου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία υποθέσεων σχετικά με την αιτιολογία και την παθογένεια αυτού καθώς και στις δυνατότητες ανίχνευσης του (13).

Τα διεθνή ποσοστά εμφάνισής του παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις, με τα υψηλότερα νούμερα να καταγράφονται σε Β. Αμερική, Αυστραλία και Ν. Ζηλανδία, μέτρια στην Ευρώπη και τα χαμηλότερα στην Ασία, την Αφρική και τη Ν. Αμερική. Το 2006 καταγράφηκαν 412000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου στην Ευρώπη, αριθμός που αντιστοιχεί στο 12,9% του συνόλου των καρκίνων (εικόνα 8) (15). Χώρες όπου πριν από τη δεκαετία του 1950 είχαν χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας από καρκίνο του εντέρου, εμφανίζουν σήμερα σημαντική αύξηση. Έχει καταγραφεί, ακόμη, αύξηση των περιστατικών καρκίνου του παχέος εντέρου μεταξύ ατόμων που

μετανάστευσαν από περιοχές με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης σε άλλες με υψηλό. Χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι Ιάπωνες μετανάστες στη Hawaii και στις ΗΠΑ κατά τη διάρκεια του 1950 και 1960: τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου αυξήθηκαν σταδιακά μέχρι να προσεγγίσουν εκείνα του γηγενούς λευκού πληθυσμού. Ανάλογες μεταβολές παρατηρήθηκαν σε Ευρωπαίους, οι οποίοι μετανάστευσαν στην Αυστραλία μετά το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο και σε Εβραίους που μετοίκησαν στο Ισραήλ από περιοχές χαμηλού κινδύνου, όπως η Υεμένη ή η Β. Αφρική. Στην Ελλάδα, όπου παρατηρείται, ακόμη, σχετική ανεπάρκεια επιδημιολογικών δεδομένων για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, το ποσοστό θανάτων από Ca παχέος εντέρου αποτελεί το 7,5% επί του συνόλου των θανάτων από καρκίνο. Η πενταετής επιβίωση από καρκίνο του παχέος εντέρου παρουσιάζει δημογραφική ποικιλότητα και με βάση εκτιμήσεις αγγίζει το 65% στη Β. Αμερική, το 54% στη Δυτική Ευρώπη, το 34% στην ανατολική Ευρώπη και το 30% στην Ινδία (16).

3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η έρευνα κατά τη διάρκεια του περασμένου και του ημίσεος του προπερασμένου αιώνα έχει καταδείξει ότι, τόσο κυτταρικοί όσο και <<χυμικοί>> παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου(3).

Οι παράγοντες εκείνοι, που κατά πάσα πιθανότητα αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου, μπορεί να είναι περιβαλλοντικοί ή ενδογενείς.

Η αναγνώριση περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου θα μπορούσε να είναι κλινικά σημαντική, αφού η τροποποίηση ή η εξάλειψη ενός ανεγνωρισμένου παράγοντα κινδύνου θα μπορούσε να ελαττώσει τον κίνδυνο για καρκίνο. Όμως, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κάνουν εμφανή την επίδρασή τους ύστερα από μακροχρόνια έκθεση σε αυτούς, συνήθως για δεκαετίες. Αυτό εξηγεί άλλωστε και την ασθενή προστατευτική επίδραση των περισσότερων πειραματικών περιβαλλοντικών παρεμβάσεων - όπως οι διαιτητικές τροποποιήσεις - το χρονικό διάστημα των τελευταίων, μόνο, χρόνων.

Οι κυριότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι οι διαιτητικοί, οι σχετικοί με τον τρόπο ζωής και τις συνήθειες του ατόμου καθώς και ανεπιθύμητες ενέργειες από προηγηθείσες θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Οι ενδογενείς περιλαμβάνουν γενετικούς παράγοντες ή οικογενειακό ιστορικό, συμπαρομαρτούντα νοσήματα ή επιδημιολογικούς παράγοντες όπως η ηλικία (13).

3Α) ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Κόκκινο κρέας – λίπος : Ο καρκίνος του παχέος εντέρου εμφανίζει τη μεγαλύτερη επίπτωση στις βιομηχανοποιημένες χώρες όπου η κατά κεφαλή ανάλωση κρεάτων, λιπών ή επεξεργασμένων υδατανθράκων είναι υψηλή (3).

Ορισμένες μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι δίαιτες που περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό κόκκινο κρέας, ζωικό λίπος ή χοληστερόλη, πιθανόν να συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου, και ιδιαίτερα με εντόπιση στο αριστερό κόλο. Συγκεκριμένα, μια συστηματική ανασκόπηση μελετών έχει δείξει

ότι η ανάλωση κόκκινου κρέατος αυξάνει τον κίνδυνο για ορθοκολικό καρκίνο - αν και δεν είναι απόλυτα σαφές αν αυτό καθεαυτό το κρέας ή ο τρόπος παρασκευής του συνδέονται με αυτή την αύξηση. Επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι, σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα, η μεγάλη κατανάλωση κρέατος, ψημένου σε υψηλές θερμοκρασίες, για παρατεταμένο χρονικό διάστημα και κυρίως σε άμεση επαφή με τη φωτιά, επηρεάζει την παραγωγή ετεροκυκλικών αμινών από κρεατινίνη ή πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, αυξάνει την παρουσία πρόδρομων νιτροζαμινών και προδιαθέτει σε καρκίνο (13,17,18).

Όσον αφορά την κατανάλωση λίπους, είναι γνωστό ότι δίαιτες πλούσιες σε λιπαρά προκαλούν μεγαλύτερη έκκριση χολικών οξέων γεγονός που συνδέεται με μεγαλύτερη επίπτωση ορθοκολικού καρκίνου. Σε πειραματόζωα, τα χολικά οξέα φαίνεται ότι λειτουργούν ως παράγοντες <<προαγωγοί>> της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, ιδιαιτέρως κατόπιν της μετατροπής τους από τους εντερικούς μικροοργανισμούς. (3) Άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η διέγερση της έκκρισης ενδογενούς ινσουλίνης που προκαλείται από τη βρώση κόκκινου κρέατος, η οποία έχει γνωστές μιτογόνες ιδιότητες (19).

Στον άνθρωπο, πλείστες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν εξαιρετικά λίγα στοιχεία που να συσχετίζουν την πρόσληψη κεκορεσμένου λίπους με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο στο παχύ έντερο και κάθε συσχέτιση τέτοιου τύπου θα πρέπει να αποδοθεί στην αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να προτείνεται περιορισμός πρόσληψης επεξεργασμένου ή κόκκινου κρέατος – ιδία μετά μαγείρεμα σε υψηλή θερμοκρασία – και αντικατάσταση αυτού από ψάρι ή πουλερικά, με στόχο τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου στο παχύ έντερο (19).

Φυτικές ίνες – φρούτα – λαχανικά : οι διαιτητικές ίνες είναι φυτικά υλικά τα οποία ανθίστανται στην πεπτική διαδικασία και αποτελούνται από ένα ετερογενές μίγμα υδατανθράκων (σελλουλόζη, ημισελλουλόζη, πεκτίνη) και μη υδατανθράκων. (13) Το 1971, Δρ. Burkitt παρατήρησε ότι, οι δίαιτες και τα κόπρανα των Νοτιοαφρικανών διέφεραν σημαντικά σε σχέση με εκείνα των Δυτικών, και είχαν και διαφορετική επίπτωση στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Έτσι πρότεινε ότι, η αυξημένη πρόσληψη ινών από τη συγκεκριμένη ομάδα ανθρώπων θα μπορούσε να λειτουργεί προστατευτικά για τον ανωτέρω τύπο καρκίνου (20).

Όπως φαίνεται, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών τα οποία εμπλουτίζουν τη δίαιτα με ίνες, συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου, ενώ για αυτή καθεαυτή την πρόσληψη ινών τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα αν και υπάρχουν ανακοινώσεις που δηλώνουν ότι όλες οι πηγές ινών έχουν πιθανά προστατευτική δράση (Melbourne Colorectal Cancer Study – 1987) (18,21).

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν : ελαττωμένη έκθεση του βλεννογόνου σε ενδοαυλικά καρκινογόνα ένεκα διέγερσης της εντερικής διάβασης, ελαττωμένη συγκέντρωση καρκινογόνων στα κόπρανα λόγω αύξησης του κοπρανώδους όγκου, ελαττωμένη συγκέντρωση χολικών οξέων στα κόπρανα λόγω δέσμευσής τους από τις ίνες και ελαττωμένη σύνθεση δευτερογενών χολικών οξέων λόγω ελάττωσης της αναερόβιας χλωρίδας από την αυξημένη συγκέντρωση ινών, αυξημένες συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου – που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των ινών από την εντερική χλωρίδα – που ελαττώνουν το ενδοαυλικό pH και έχουν αντικαρκινική δράση

και τέλος σταθεροποίηση των επιπέδων ινσουλίνης ένεκα της επιβράδυνσης της απορρόφησης των σιτηρών που σε άλλη περίπτωση θα προήγαγαν την καρκινογένεση στο έντερο.

Μέχρι σήμερα, ο βαθμός προστασίας που προσφέρει η κατανάλωση λαχανικών, φρούτων ή διαιτητικών ινών στον καρκίνο του παχέος εντέρου παραμένει ασαφής. (13)

Κάπνισμα : ο παθογενετικός ρόλος του καπνίσματος στους καρκίνους του αναπνευστικού και του ουροποιητικού καθώς και στα καρδιοαναπνευστικά νοσήματα είναι ήδη επαρκώς κατανοητός και αποδεκτός. Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι το κάπνισμα δεν σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο (22). Σήμερα, πάντως, φαίνεται ότι η επίδραση του καπνίσματος στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου απαιτεί αρκετές δεκαετίες έκθεσης για να καταστεί εμφανής, αν και η σχέση μεταξύ τσιγάρου και ορθοκολικού καρκίνου είναι ασθενέστερη εκείνης μεταξύ τσιγάρου και καρκίνου του αναπνευστικού.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου σε μακροχρόνιους καπνιστές είναι σχεδόν διπλάσιος εκείνου του γενικού πληθυσμού. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι δυστυχώς ανεπαρκώς διευκρινισμένοι: καρκινογόνα υποπροϊόντα του καπνού μεταφέρονται στο αίμα και στη συνέχεια διαχέονται στο έντερο ενώ ταυτόχρονα ο καπνός που εισέρχεται στον οργανισμό από το στόμα μπορεί να καταποθεί με την τροφή και να φθάσει στον εντερικό αυλό (23).

Αλκοόλ : η συσχέτιση της πρόσληψης αιθυλικής αλκοόλης με την ανάπτυξη αδενωμάτων και καρκινωμάτων στο παχύ έντερο έχει καταγραφεί σε πλείστες – αν και όχι σε όλες – τις προοπτικές μελέτες κοόρτης ή σύγκρισης. Συγκεντρωτική ανάλυση οκτώ κοορτικών μελετών έδειξε ότι ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου ήταν 1,24 στις περιπτώσεις εκείνες όπου η κατανάλωση αλκοόλ ξεπερνούσε τα 30g/ημέρα σε σύγκριση με τη χαμηλή πρόσληψη. Επειδή οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ με την υψηλότερη πρόσληψη αιθανόλης, δεν είναι γνωστό εάν η κατανάλωση < 30g/ημέρα έχει επίδραση στον κίνδυνο αυτό. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανόν αποτέλεσμα της ελαττωμένης πρόσληψης και απορρόφησης φυλλικού οξέος στους αλκοολικούς ασθενείς (19).

Σωματική μάζα – φυσική δραστηριότητα : τόσο η παχυσαρκία όσο και ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου έχουν παρουσιάσει αύξηση στις Δυτ. Χώρες, η δε μεταξύ τους συσχέτιση έχει καταδειχθεί σε επιδημιολογικές μελέτες (24). Σαφής κατανόηση των σχετικών μηχανισμών δεν έχει επιτευχθεί μέχρι τούδε. Ορμονικοί παράγοντες στις γυναίκες ή ο μεταβολισμός της ινσουλίνης ή μεταβολές στις φλεγμονώδεις διαδικασίες εμπλέκονται πιθανόν, ενόσω έχει βρεθεί ισχυρά θετική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος (BMI) και της προσταγλανδίνης E2 του βλεννογόνου που αποτελεί δείκτη φλεγμονής. Σε πειραματικό επίπεδο, δεν υπάρχει αξιολόγηση αυτής της συσχέτισης αλλά ούτε και της πιθανότητας η απώλεια βάρους να μειώνει τον κίνδυνο για καρκίνο στο παχύ έντερο (23).

Η φυσική δραστηριότητα – παράγων κατανάλωσης και ισοζυγίου ενέργειας – συνδέεται με ελαττωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου στις περισσότερες πρόσφατες μελέτες (24). Ο μηχανισμός αυτής της προστατευτικής επίδρασης δεν είναι γνωστός : ο Martinez και συν. έδειξαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ

επιπέδων προσταγλανδίνης E2 του ορθικού βλεννογόνου και φυσικής δραστηριότητας (25).

Ακτινοθεραπεία στην πύελο : προηγηθείσα έκθεση της πυέλου σε ακτινοβολία αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου μετά από πάροδο 5 – 10 ετών. Μεγάλη αναδρομική μελέτη αναφέρει αυξημένο κίνδυνο ορθικού καρκίνου σε ασθενείς με ιστορικό ακτινοθεραπείας για καρκίνο του προστάτη, και μάλιστα με μέγεθος κινδύνου ανάλογο με αυτό ασθενών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου, γεγονός που δημιουργεί την ανάγκη στενότερης επιτήρησης χωρίς να είναι σαφές εάν αυτή με τη σειρά της εξασφαλίζει βελτιωμένη έκβαση ή πρόγνωση (26,27).

Χολοκυστεκτομή : ορισμένες μελέτες έχουν περιγράψει συσχέτιση προηγηθείσας χολοκυστεκτομής με ΔΕ κολικό καρκίνο. Η συνεχής έκθεση του παχέος εντέρου στα ενδυνάμει καρκινογόνα χολικά οξέα – απουσία χοληδόχου κύστης – καθώς και μια μετατόπιση από τα πρωτογενή στα δευτερογενή χολικά οξέα που συνεπάγεται αύξηση της αναγεννητικής δραστηριότητας του εντερικού βλεννογόνου, έχουν υποστηριχθεί ως πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί. Πάραυτα, τα δημοσιευθέντα δεδομένα είναι αντιφατικά προς το παρόν (13).

Ουρητηροσιγμοειδική αναστόμωση : με πιθανούς μηχανισμούς καρκινογένεσης τη συνεχή έκθεση του εντερικού βλεννογόνου σε καρκινογόνα των ούρων (μετατροπή των νιτρικών αλάτων των ούρων σε νιτροζαμίνες από τα εντερικά βακτηρίδια) ή τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του βλεννογόνου κατά τη διάρκεια επιδιόρθωσης των - προκληθεισών από τα ούρα – βλαβών, οι ουρητηροκολικές αναστομώσεις μετά από μείζονα χειρουργεία του πεπτικού ή ουροποιητικού αποτελούν θέσεις πλησίον των οποίων παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου, σύμφωνα με λίγες δημοσιευθείσες μελέτες. Ασθενείς με ουρητηροσιγμοειδική αναστόμωση έχουν 100 έως 550 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου – συνήθως αδενοκαρκινώματος – από το γενικό πληθυσμό, πολλά χρόνια μετά την επέμβαση, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να υποβάλλονται σε περιοδικό ενδοσκοπικό έλεγχο, ο οποίος πρέπει να αρχίζει 5 έτη μετά τη διενέργεια της αναστόμωσης (26,28,29).

3B) ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ηλικία : ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου αυξάνεται απότομα μετά την ηλικία των 40 ετών στο γενικό πληθυσμό, με το 90% των περιπτώσεων να εμφανίζονται σε άτομα άνω των 50 ετών. Προτεινόμενος παθογενετικός μηχανισμός είναι η συσσωρευση επίκτητων μεταλλάξεων στα εντερικά κύτταρα με την πάροδο του χρόνου(30). Εντούτοις, σποραδικοί καρκίνοι αναπτύσσονται και σε άλλες ηλικιακές ομάδες, όπως η τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής, και η διάγνωσή τους θα πρέπει να πιθανολογείται σε άτομα νεαρότερης ηλικίας με συμπτώματα και σημεία χαρακτηριστικά της νόσου – ιδία όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό εντερικής νεοπλασίας (13).

Ορμονικοί – αυξητικοί παράγοντες : το επιθήλιο του παχέος εντέρου εκτίθεται σε μια ποικιλία ενδογενών παραγόντων, οι οποίοι ασκούν τροφική επίδραση στο βλεννογόνο του πεπτικού σωλήνα. Συγκεκριμένα η γαστρίνη, η οποία εκκρίνεται από τα G – κύτταρα του άντρου, φαίνεται ότι αποτελεί τη γαστρεντερική ορμόνη με την πλέον

άμεση συσχέτιση με την καρκινογένεση στο παχύ έντερο. Κι άλλες πεπτιδικές ορμόνες, πάντως, πιθανόν να επηρεάζουν την ανάπτυξη νεοπλασιών στο έντερο : ασθενείς με αυξημένη έκκριση αυξητικής ορμόνης (ακρομεγαλία), σωματομεδίνης και αυξητικών παραγόντων που ομοιάζουν της ινσουλίνης (IGFS) έχουν συσχετισθεί με το C-Harvey ras-1 ογκογονίδιο, το οποίο εκφράζεται στο 50% των ορθοκολικών καρκίνων (3). Σύμφωνα με δημοσιευθέντα στοιχεία μελετών, έχουν καταγραφεί υψηλά ποσοστά επιπολασμού καρκίνου (5% – 25%) και αδενωματοδών πολυπόδων (14% - 35%) του παχέος εντέρου στους ασθενείς με ακρομεγαλία. Ο κίνδυνος για ΚΠΕ είναι πιθανά μεγαλύτερος σε νεαρότερης ηλικίας ασθενείς και σε αυτούς με οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ, πολλαπλά δερματικά ράκη (ακροχόρδωνες) ή ιστορικό αδενωμάτων παχέος εντέρου (13).

Κι άλλοι, πάντως, παράγοντες έχουν σχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης στο έντερο, όπως ο πρωτοπαθής και ο οικογενής υπερπαραθυρεοειδισμός. Οι στεροειδείς ορμόνες, επίσης, και κυρίως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα, έχουν κεντρικό ρόλο στην προσπάθεια εξήγησης του υψηλότερου κινδύνου που παρουσιάζουν οι γυναίκες με καρκίνο του μαστού για ανάπτυξη όγκων στον πεπτικό σωλήνα. Οι ορμόνες αυτές, πιθανόν εκδηλώνουν την ογκο-ρυθμιστική τους δράση έμμεσα, μέσω αλληλεπίδρασης με κάποια αλληλουχία του πυρηνικού DNA που ρυθμίζει τη μεταγραφή ενός ελέγχοντος την αλληλουχία RNA αυξητικού παράγοντα που προσδένεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Πάραυτα, η αντιοιστρογονική θεραπεία δεν απέδωσε στην κλινική αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου (3).

Σακχαρώδης διαβήτης : μια μετα-ανάλυση 15 μελετών έχει δείξει αυξημένο κίνδυνο καρκίνου στο παχύ έντερο σε διαβητικούς ασθενείς σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς. Μια πιθανή εξήγηση για μια τέτοια συσχέτιση είναι η υπερινσουλιναμία αφού και η ινσουλίνη αλλά και ο ομοιάζων της ινσουλίνης αυξητικός παράγοντας αποτελούν παράγοντες σημαντικούς για την αύξηση των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου και τη διέγερση των νεοπλασματικών κυττάρων στην ίδια περιοχή. Έχει ανακοινωθεί, ακόμη, συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του C- πεπτιδίου – που συνιστά δείκτη παραγωγής ινσουλίνης – και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου (31).

HIV λοίμωξη: ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει αυξημένη επίπτωση καρκίνου του παχέος εντέρου σε ασθενείς με HIV λοίμωξη. Αυτό φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης προδιάθεσης για καρκινογένεση λόγω της χρόνιας ανοσοκαταστολής (32). Σε ορισμένες άλλες, πάντως, δεν αναφέρεται τέτοια συσχέτιση (33).

Γενετική - Οικογενειακό ιστορικό : έχει πλέον καταστεί σαφές ότι η γενετική προδιάθεση παίζει πρωταρχικό ρόλο για ένα σημαντικό αριθμό καρκίνων στο παχύ έντερο. Όλοι οι καρκίνοι στο παχύ έντερο έχουν γενετικό υπόβαθρο το οποίο είναι είτε κληρονομικό ή επίκτητο σε άλλοτε άλλο βαθμό. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς με οικογενή καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν γεννηθεί με μεταλλαγμένο γονιδίωμα, στο οποίο το περιβάλλον έχει επιφέρει επιπρόσθετες αλλαγές με αποτέλεσμα έναν κακοήθη φαινότυπο. Στις περιπτώσεις δε των σποραδικών καρκίνων, το περιβάλλον έχει συμβάλλει αποφασιστικά στη δημιουργία πολλαπλών σωματικών μεταλλάξεων.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου σε συγγενείς α΄ βαθμού ασθενών με σποραδικό καρκίνο στο παχύ έντερο είναι δύο με τρεις φορές αυξημένος. Ο κίνδυνος αυξάνεται όταν ο καρκίνος κάνει την εμφάνισή του στο συγγενή σε νεαρότερη ηλικία ή όταν προσβάλλει περισσότερους του ενός συγγενείς (13).

Ο ρόλος της κληρονομικότητας στη διαδικασία καρκινογένεσης στο παχύ έντερο καθίσταται εμφανής στις περιπτώσεις ασθενών με κληρονομικά σύνδρομα πολυποδίασης, όπως το σύνδρομο Gardner, για τα οποία θα ακολουθήσει εκτενέστερη αναφορά σε επόμενη ενότητα.

Ο κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC) είναι μια κληρονομούμενη νόσος στην οποία ο καρκίνος αναπτύσσεται σε έδαφος μεμονωμένων αδενωμάτων. Τυπικά, οι ασθενείς εμφανίζουν λίγους μόνον πολύποδες στο έντερο. Ο καρκίνος εντοπίζεται συνήθως στο δεξί κόλο, είναι συνήθως βλεννώδης και έχει καλύτερη πρόγνωση από το σποραδικό καρκίνο (34). Ξεκινά ως επίπεδος πολύποδας κατά τη μέση ηλικία.

Ο HNPCC κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα (με γονιδιακή διεισδυτικότητα 80%) και αποτελεί το 6% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Κατά προσέγγιση, το 80% αυτών των καρκίνων οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων επιδιόρθωσης των σφαλμάτων του DNA που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του. Συγκεκριμένα, στη φάση σύνθεσης του DNA, η DNA πολυμεράση μπορεί να δημιουργήσει λάθη στο ταίριασμα των ζευγών βάσεων με αποτέλεσμα δομικές ανωμαλίες της διπλής έλικας. Αυτές οι μεταβολές, οι οποίες αφορούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, καλούνται μικροδορυφόροι και επιδιορθώνονται από ένζυμα που κωδικοποιούν τα MMR γονίδια. Κύτταρα με μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης δεν δύνανται να διορθώσουν τις βλάβες στο DNA και προοδευτικά αθροίζουν μεταλλάξεις - λόγω των επαναληπτικών αντιγραφών του DNA - με συνέπεια την απόκτηση υπερβολικής ικανότητας μετάλλαξης και το χάος. Η άθροιση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να καταλήξει σε καρκίνο στο παχύ έντερο (14).

Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων των MMR γονιδίων αφορά το hMSH2 γονίδιο στο χρωμόσωμα 2 (40% - 50% των περιπτώσεων) και το hMLH1 γονίδιο στο χρωμόσωμα 3 (20% - 30%). Εντούτοις, μεταλλάξεις στα γονίδια hMSH6, hPMS1 και hPMS2 έχουν αναφερθεί σε ένα μικρό αριθμό ασθενών. Η κλινική διάγνωση του HNPCC στηρίζεται στα κριτήρια του Amsterdam II, τα οποία είναι τα ακόλουθα : α) τουλάχιστον τρεις ή και περισσότεροι συγγενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο καρκίνο του παχέος εντέρου, εκ των οποίων ο ένας με συγγένεια α΄ βαθμού με τους άλλους δύο β) ο καρκίνος να έχει προσβάλλει τουλάχιστον δύο διαδοχικές γενιές και γ) τουλάχιστον η μια διάγνωση να αφορά ασθενή κάτω των 50 ετών. Λόγω της συχνής εμφάνισης εξωεντερικών καρκίνων σε τέτοιες οικογένειες ασθενών αναπτύχθηκαν ευρύτερα κλινικά κριτήρια, οι <<Bethesda Οδηγίες>> που αναφέρονται στον πίνακα 1. Τοιούτοτρόπως, οικογένειες ασθενών με HNPCC που εντοπίζεται αποκλειστικά στο παχύ έντερο πάσχουν από σύνδρομο Lynch I ενώ σε οικογένειες όπου συνυπάρχει επιρρέπεια για καρκίνο του γυναικείου γεννητικού συστήματος ή άλλων θέσεων υπάρχει το σύνδρομο Lynch II. Στα HNPCC σύνδρομα, τα αδενώματα - στο έδαφος των οποίων αναπτύσσεται ο καρκίνος - έχουν επίπεδη ή ελαφρώς επηρμένη εμφάνιση με τις εστίες της αδενωματούδους

εξαλλαγής στο ανώτερο ήμισυ των κρυπτών και η συνήθης ηλικία εμφάνισής τους είναι τα 40 – 50 έτη , δηλαδή 2 δεκαετίες νωρίτερα από εκείνη του ορθοκολικού καρκίνου στο γενικό πληθυσμό. Οι βιολογικοί δείκτες των ασθενών με HNPCC είναι παρόμοιοι με εκείνους ασθενών με FAP.

Πίνακας 1 . Οδηγίες Bethesda για τον έλεγχο καρκίνου του παχέος εντέρου για μικροδορυφορική αστάθεια (Feldman M, Friedman L, Brandt L. Sleisinger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Diseases 2010. 9th ed).

ΟΔΗΓΙΕΣ BETHESDA ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΚΑΡΚΙΝΩΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕ MSI

1. Ασθενείς με καρκίνο από οικογένειες που πληρούν τα κριτήρια του Amsterdam
2. Ασθενείς με δύο HNPCC σχετιζόμενους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων σύγχρονων ή μετάρχρονων ορθοκολικών καρκίνων ή εξωεντερικών καρκίνων (ενδομητρίου, ωοθηκών, γαστρικού, ηπατοχολικού, ή καρκίνου του λεπτού εντέρου ή καρκίνου της νεφρικής πυέλου ή του ουρητήρα)
3. Ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και συγγενή α' βαθμού με καρκίνο του παχέος εντέρου και/ή HNPCC σχετιζόμενο εξωεντερικό καρκίνο και/ή αδένωμα παχέος εντέρου: εις εκ των καρκίνων να έχει διαγνωσθεί πριν την ηλικία των 45 ετών, και το αδένωμα πριν την ηλικία των 40 ετών
4. Ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου ή καρκίνο του ενδομητρίου διαγνωσμένο πριν την ηλικία των 45 ετών
5. Ασθενείς με καρκίνο του αριστερού κόλου με αδιαφοροποίητο ιστοπαθολογικό χαρακτήρα διαγνωσμένο πριν την ηλικία των 45 ετών
6. Ασθενείς με δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου καρκίνο του παχέος εντέρου διαγνωσμένο πριν την ηλικία των 45 ετών
7. Ασθενείς με αδενώματα διαγνωσμένα πριν την ηλικία των 45 ετών.

Οι γενετικές μεταβολές που οδηγούν στην ανάπτυξη καρκίνου θα συζητηθούν κατωτέρω.

Ιστορικό αδενώματος ή καρκινώματος παχέος εντέρου : με βάση τα υπάρχοντα πρόσφατα στοιχεία, οι περισσότεροι καρκίνοι στο παχύ έντερο αναπτύσσονται σε έδαφος προϋπαρχόντων αδενωμάτων. Ο κίνδυνος, μάλιστα, αυξάνεται με τον αριθμό των αδενωμάτων με πιο ακραίο παράδειγμα το σύνδρομο οικογενούς πολυποδίασης. Καθώς, επίσης, τα αδενώματα μεγαλώνουν, αποδιαφοροποιούνται προοδευτικά, καθίστανται δυσπλαστικά και στο τέλος κακοήθη. Επίσης, με την αύξηση του μεγέθους ή την εμφάνιση θηλώδους αρχιτεκτονικής, επέρχεται αύξηση στην κυτταρική ατυπία, εμφανίζεται συχνότερα κυτταρική ατυπία, δυσπλασία και in situ ή διηθητικό καρκίνωμα. Οι αδενωματώδεις πολύποδες είναι συχνοί, ιδία μετά την ηλικία των 50 ετών, σε πληθυσμούς με Δυτικού τύπου διαιτολόγιο. Η πιθανότητα κακοήθειας είναι μεγαλύτερη σε ευμεγέθη αδενώματα, σε αδενώματα με θηλώδη αρχιτεκτονική καθώς και σε αδενώματα με πυρηνική ατυπία ή δυσπλασία. Ο εκτιμηθείς ετήσιος ρυθμός μετάπτωσης σε διηθητικό καρκίνο ασθενών με αδενώματα μεγαλύτερα του 1 cm, με θηλώδη αρχιτεκτονική ή σοβαρή δυσπλασία είναι 3%, 17% και 37% αντίστοιχα. Σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος συνύπαρξης και δεύτερου καρκινώματος (σύγχρονο καρκίνωμα) ή μετέπειτα ανάπτυξης αυτού

(μετάχρονο καρκίνωμα). Πλείστοι ασθενείς με ταυτόχρονους καρκίνους έχουν συνήθως έναν στο εγγύς και τον άλλο στο άπω κόλο, με σπάνια εξαίρεση την περίπτωση συνύπαρξης και των δύο στο ίδιο εντερικό τμήμα. Ο βαθμός διηθητικής ικανότητας των σύγχρονων καρκίνων διαφέρει και η πρόγνωση εξαρτάται από τη <<χειρότερου σταδίου>> βλάβη. Το χρονικό διάστημα μεταξύ του αρχικού και του μετάχρονου καρκίνου μπορεί να είναι αρκετά μεγάλο – έχει αναφερθεί μέχρι και 23 έτη – με το 50% των <<δεύτερων>> βλαβών να εμφανίζονται 5 έως 7 χρόνια μετά την πρώτη βλάβη. Οι μετάχρονοι καρκίνοι εντοπίζονται συνήθως σε απομακρυσμένες θέσεις από την αρχική εστία.

Ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερικά νοσήματα (ΙΦΝΕ) : ο όρος περιλαμβάνει τις παθολογικές εκείνες καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από μια τάση χρόνιας ή υποτροπιάζουσας ανοσοδιέγερσης και φλεγμονής εντός του γαστρεντερικού σωλήνα. Οι κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι η ελκώδης κολίτιδα (ΕΚ) και η νόσος του Crohn (NC). Αν και οι δύο αυτές νοσολογικές οντότητες μοιράζονται πολλά επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά – γεγονός που υποδηλεί παρεμφερή υποκείμενη αιτιοπαθογένεια και ενίοτε καθιστά δυσχερή τη διαφορική διάγνωση (ενδιάμεση κολίτις) – πρόκειται στην ουσία για δύο διαφορετικά σύνδρομα με διαφορετική πρόγνωση και αντιμετώπιση (13).

Η συχνότητα εμφάνισής τους είναι μεγαλύτερη στη Β. Αμερική και στη Β. και Δυτική Ευρώπη, μικρότερη στη Ν. Αφρική, στην Αυστραλία και στη Ν. και Κεντρική Ευρώπη και σπανίζει στην Ασία και Αφρική.

Γενικά, φαίνεται ότι η επίπτωση των ΙΦΝΕ αυξάνεται σε βιομηχανοποιημένες περιοχές και πληθυσμούς. Ιδιαίτερος ενδιαφέρον χαρακτηριστικό αποτελεί το κλείσιμο της ψαλίδας μεταξύ των επιπτώσεων των δύο νόσων : ενώ η σχέση ΕΚ/ NC ήταν περίπου 5:1, αγγίζει πλέον το $\approx 2:1$ (35).

Παρά το γεγονός ότι η αιτιολογία των ΙΦΝΕ παραμένει άγνωστη, η παθογένειά τους εξιχνιάζεται με το χρόνο και φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων. Σύμφωνα με την επικρατούσα θεωρία πρόκειται για μια υπέρμετρη και απρόσφορη ανοσολογική απάντηση ενός γενετικά προδιατεθειμένου οργανισμού σε αντιγόνα του εντερικού αυλού, που οδηγεί σε ανάπτυξη φλεγμονής.

Και τα δύο νοσήματα έχουν πολυγονιδιακή βάση και η αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων ή των γονιδίων και του περιβάλλοντος έχει ιδιαίτερη σημασία στην παθογένειά τους. Από ότι φαίνεται υπάρχουν διαφορετικές, γενετικά, υποομάδες ασθενών, που σχετίζονται με συγκεκριμένη ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή και με συγκεκριμένη πρόγνωση.

Μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια, όπως στο NOD2 του χρωμοσώματος 16, στον υποδοχέα της IL-23R του χρωμοσώματος 1p31 και στο 'ATG16 – autophagy –related 16-like 1' γονίδιο του χρωμοσώματος 2q37 έχουν σχετισθεί τελευταία με ανάπτυξη της νόσου Crohn. Αν και από το 2001 έχει βρεθεί συσχέτιση των NOD2 μεταλλάξεων με τη νόσο του Crohn, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου δεν έχει διαλευκανθεί.

Από την άλλη, ο πεπτικός σωλήνας του ανθρώπου αποικίζεται από μια πληθώρα μικροβίων – 500–1000 είδη – τα οποία αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με τον

ξενιστή τους με εν πολλοίς περίπλοκο και άγνωστο τρόπο. Με βάση αρκετά δεδομένα, οι ΙΦΝΕ οφείλονται σε μια υπερβολική ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού σε κάποια συστατικά της μικροβιακής εντερικής χλωρίδας, χωρίς εντούτοις να είναι γνωστό εάν η απόκριση αυτή αφορά όλη τη χλωρίδα, μια υποομάδα αυτής ή ένα μόνον είδος. Ο γενετικός καθορισμός των εντερικών μικροοργανισμών και των παραγώγων τους σε ασθενείς ΙΦΝΕ αλλά και σε φυσιολογικά άτομα αναμένεται να δώσει όλη εκείνη την πληροφόρηση η οποία θα είναι διευκρινιστική για την παθογένεια αυτών των νοσημάτων.

Το μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο του εντερικού σωλήνα εμποδίζει την είσοδο των αντιγόνων του αυλού αλλά και την επαφή τους με το ανοσολογικό σύστημα του χορίου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των ισχυρών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, την έκκριση βλέννης υψηλής περιεκτικότητας σε ανοσοσφαιρίνη IgA και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Στις ΙΦΝΕ, έχει παρατηρηθεί αυξημένη διαπερατότητα του επιθηλίου, τόσο σε φάσεις έξαρσης όσο και σε πριν από την υποτροπή.

Όσον αφορά τους ανοσολογικούς παράγοντες, ο φυσιολογικός εντερικός βλεννογόνος διαθέτει ένα σημαντικό αριθμό Β και Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία αυξάνονται στις ΙΦΝΕ ακόμη και σε απουσία κλινικών ή ενδοσκοπικών σημείων φλεγμονής. Η επαφή των Τ λεμφοκυττάρων με τα αντιγόνα των βακτηριδίων έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των πρώτων. Στη νόσο του Crohn τα Τ κύτταρα αντιστέκονται στην απόπτωση, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους, την απελευθέρωση κυτταροκινών και τη διαίωνιση της φλεγμονής. Τα Β λεμφοκύτταρα του βλεννογόνου, αντίστοιχα, υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγουν ανοσοσφαιρίνη IgA. Στη νόσο του Crohn, όμως, αυξάνονται σε αριθμό και εκκρίνουν κυρίως ανοσοσφαιρίνη IgG2.

Η αρχική έρευνα σχετικά με την ανοσολογική συμμετοχή στις ΙΦΝΕ είχε εστιάσει αποκλειστικά και μόνον στην επίκτητη ανοσία. Η ανακάλυψη όμως της εμπλοκής των μεταλλάξεων του γονιδίου NOD2 στη νόσο του Crohn, ενός γονιδίου δηλαδή που κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης που συνιστά ενδοκυττάριο υποδοχέα, καθώς και αυτών του γονιδίου ATG16L1 που είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία των μικροβίων, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι οι ανοσοανεπάρκειες με διαταραχή της κληρονομικής ανοσίας σχετίζονται με εντερική βλεννογονική φλεγμονή οδήγησε στην ανάδειξη του ρόλου της κληρονομικής ανοσίας στην παθογένεια των ΙΦΝΕ. Ως γνωστόν, η κληρονομική ανοσία αντιπροσωπεύει την εγγενή άμυνα του οργανισμού, που δεν απαιτεί προηγούμενη έκθεση σε παθογόνο παράγοντα για επαγωγή απάντησης, και της οποίας το κυτταρικό σκέλος στο γαστρεντερικό σωλήνα περιλαμβάνει διαφόρους τύπους επιθηλιακών κυττάρων (πχ απορροφητικά, καλυκοειδή, νευροενδοκρινικά, κύτταρα Paneth) αλλά και λευκοκυττάρων (NK κύτταρα, ουδετερόφιλα, δενδριτικά, μακροφάγα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα). Οι πλέον πρόσφατες μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα δείχνουν ότι η κληρονομική ανοσία διαδραματίζει ίσως τον σημαντικότερο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου ενώ οι διαταραχές της μπορεί να οδηγήσουν σε υπερβολική ανοσολογική απάντηση - μέσω της επίκτητης ανοσίας - έναντι της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας και έναρξη μιας μη ελεγχόμενης φλεγμονής του

τύπου των ΙΦΝΕ. Ιδιαίτερο ρόλο τόσο στην κληρονομική όσο και στην επίκτητη ανοσία κατέχουν οι εξωκυττάριοι υποδοχείς TLRs (Toll Like Receptors), οι οποίοι ανευρίσκονται στα δενδριτικά, τα μακροφάγα αλλά και τα επιθηλιακά κύτταρα (MCH II) και οι οποίοι αφού πρώτα αναγνωρίσουν, κατόπιν συνδέονται με τα βακτηριδιακά προϊόντα. Οι πεπτιδογλυκάνες και οι λιποπρωτείνες των Gram(+) μικροβίων ενεργοποιούν τα δενδριτικά κύτταρα μέσω TLR2 υποδοχέα, τα λιποπολυσακχαρίδια των Gram(-) μικροβίων προκαλούν ενεργοποίηση μέσω TLR4 υποδοχέα ενώ τα διουκλεοτίδια μέσω TLR9 υποδοχέα αντίστοιχα. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι οι υποδοχείς TLR2 ευοδώνουν την επουλωτική διαδικασία σε κολίτιδα ρυθμίζοντας την ακεραιότητα του επιθηλίου. Οι Lodes et al (2004), ανεγνώρισαν το βακτηριδιακό αντιγόνο flagelin, το οποίο συνδέεται με τον TLR5 υποδοχέα και το οποίο θεωρείται το βασικό αντιγόνο που διεγείρει Th1 απάντηση σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Αντισώματα έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου ανευρίσκονται συχνά σε ασθενείς με νόσο του Crohn όχι όμως και σε εκείνους με ΕΚ. Στους ασθενείς, επίσης, με νόσο του Crohn έχει παρατηρηθεί ότι η ανεύρεση μιας τουλάχιστον μετάλλαξης του γονιδίου NOD2 συνδέεται με αυξημένη αντίδραση έναντι του anti-CBiR1 flagellin αντιγόνου. Σημαντικός είναι, ακόμη, ο ρόλος των κυττάρων Paneth στη διατήρηση της ομοιόστασης στο έντερο μέσω της έκκρισης αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Τα κύτταρα Paneth έχουν τη δυνατότητα να έρχονται σε επαφή με τα βακτηριδιακά προϊόντα μέσω των ενδοκυττάρων υποδοχέων της κληρονομικής ανοσίας. Μελέτες αναφέρουν μειωμένη παραγωγή α-defensins από τα κύτταρα Paneth, σε ασθενείς με νόσο εντοπισμένη στον τελικό ειλέο - αλλά όχι και στο παχύ έντερο - καθώς και σε ασθενείς με μετάλλαξη στο NOD2 γονίδιο. Πιθανόν η ελάττωση αυτή της παραγωγής α-defensins από τα κύτταρα Paneth να αποτελεί το μηχανισμό μέσω του οποίου η μετάλλαξη που οδηγεί σε μειωμένη λειτουργία του υποδοχέα, να οδηγεί και στη νόσο του τελικού ειλεού.

Στα πλαίσια ενεργοποίησης της επίκτητης ανοσίας, το δικό της ρόλο φαίνεται ότι διαδραματίζει η παρουσίαση αντιγόνων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) στα Τ-κύτταρα. Για την επίτευξη της συγκεκριμένης διαδικασίας, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να έρθουν σε επαφή τα αντιγόνα του εντερικού αυλού με τα APCs του χορίου, τα οποία αντιπροσωπεύονται κυρίως από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ότι η μεταφορά των αντιγόνων από τον αυλό στο χόριο γινόταν μόνον κατόπιν συλλήψεώς τους από τα Μ επιθηλιακά κύτταρα. Κατόπιν, όμως της δημοσίευσης των αποτελεσμάτων της μελέτης των Rescigno et al (2001), προέκυψε μία δεύτερη σχετική θεωρία σύμφωνα με την οποία τα δενδριτικά κύτταρα συλλαμβάνουν απευθείας τα αντιγόνα μέσω κυτταροπλασματικών προσεκβολών που εκτείνονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων προς τον εντερικό αυλό. Μια τρίτη, επίσης, θεωρία στέκεται στην εμπλοκή του νεογνικού υποδοχέα Fc (FcRn), ως μέσου μεταφοράς της IgG του χορίου διαμέσου του επιθηλίου του παχέος εντέρου στον εντερικό αυλό, όπου μπορεί να συνδεθεί με αντιγόνα των βακτηριδίων, και στη συνέχεια, ως σύμπλεγμα αντιγόνου/IgG, να επιστρέψει στο χόριο και αφού συνδεθεί με τα δενδριτικά κύτταρα, να επιτευχθεί η παρουσίαση του αντιγόνου στα Τ-κύτταρα. Όποια θεωρία κι αν ισχύει, πάντως, από τη στιγμή που η αντιγονική

παρουσίαση αποτελεί το πρώτο βήμα στην ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας, μια πιθανή αναστολή της θα μπορούσε να έχει θεραπευτικό ενδιαφέρον για τις ΙΦΝΕ. Πρόσφατες, σχετικά, μελέτες σε πειραματόζωα έχουν αναδείξει τη συμμετοχή των IL-23/IL17 στην παθογένεια της νόσου του Crohn. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η ανάπτυξη κοκκιωμάτων – που αποτελούν χαρακτηριστικό της νόσου του Crohn – γίνεται με τη μεσολάβηση μιας κατηγορίας δενδριτικών κυττάρων, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-23. Στον άνθρωπο, πρόσφατη μελέτη καταδεικνύει αρνητική σχέση ανάμεσα στον πολυμορφισμό του υποδοχέα της IL-23 και της εκδήλωσης ΙΦΝΕ ενώ άλλη μελέτη συσχετίζει τον πολυμορφισμό του συγκεκριμένου υποδοχέα με νόσο του Crohn σε παιδιά μη Εβραϊκής καταγωγής.

Μία άλλη υποκατηγορία T-κυττάρων, τα Th17 τα οποία παράγουν την IL-17A και την IL-17F και όχι IFN και IL-4, ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες (πχ IL-6, ρετινοϊκό οξύ) και η επιβίωσή τους εξαρτάται από την IL-23. Σε φυσιολογικό παχύ έντερο η έκφραση IL-17 δεν είναι ανιχνεύσιμη, ενώ ακριβώς το αντίθετο ισχύει σε ασθενείς με νόσο ανεξαρτήτως της ενεργότητας αυτής. Ο παθογενετικός ρόλος της IL-17 έχει αποδειχτεί σε πειραματόζωα: η εξουδετέρωση αυτής της κυτταροκίνης οδηγεί σε καταστολή της χρόνιας κολίτιδας ενώ η απουσία του υποδοχέα IL-17 οδηγεί αντίστοιχα σε αντοχή στην ανάπτυξη κολίτιδας σε επίμυες.

Σήμερα, πλέον γνωρίζουμε ότι τα Th1 και τα Th17 κύτταρα είναι αυτά που συμμετέχουν στην ανοσολογική αντίδραση στη νόσο του Crohn, και τα Th2 κύτταρα στην ελκώδη κολίτιδα. Επίσης, πολλαπλά είδη κυττάρων – συμπεριλαμβανομένων των B κυττάρων και υποομάδων των δενδριτικών – και πολλαπλοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην ανοσιακή διαδικασία των ΙΦΝΕ. Τα σημαντικότερα είδη κυττάρων είναι τα ρυθμιστικά κύτταρα (Treg) τα οποία διακρίνονται σε φυσικά (nTreg) και σε επίκτητα. Τα φυσικά παράγονται από το θύμο αδένος και έχουν υποδοχείς με μεγάλη συνάφεια για τα αυτό-αντιγόνα, ενώ τα επίκτητα παράγονται σε άλλες θέσεις από το θύμο αδένος σε απάντηση σε αντιγόνα που εμφανίζονται σε διάφορα όργανα ή στο λεμφικό ιστό. Μια μικροβιακή λοίμωξη διεγείρει τα Treg και πιθανόν να είναι συγκεκριμένα τα μικρόβια που προκαλούν τέτοια διέγερση. Τα Treg υπάρχουν σε αφθονία στο εντερικό χόριο αλλά είναι άγνωστο ποια είναι τα αντιγόνα που τα διεγείρουν. Επίσης, αναστέλλουν την ανοσολογική απάντηση μέσω πολλαπλών μηχανισμών όπως η παραγωγή ανασταλτικών κυτταροκινών (IL-10, TGFβ). Η εξάλειψη ενός από τα δύο αυτά γονίδια, οδηγεί σε φλεγμονή στο έντερο αλλά και σε διαταραχή της κληρονομικής ανοσίας παράλληλα με την ανεπάρκεια των Treg.

Γενικότερα, στο παρελθόν υπήρχε η άποψη ότι η παραγωγή ανοσοσφαιρινών αποτελούσε την κύρια λειτουργία των B λεμφοκυττάρων. Γνωρίζουμε, όμως πλέον ότι τα κύτταρα αυτά έχουν περισσότερες λειτουργίες όπως την παραγωγή κυτταροκινών (IL-10 και IL-12) σε φλεγμονώδεις καταστάσεις και την λειτουργία τους ως δευτερογενή APCs που περιορίζουν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (36).

Η νόσος του Crohn αντιπροσωπεύει μια χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία, η οποία δύναται να προσβάλλει οιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα από το στόμα έως τον πρωκτό. Πάραυτα, οι συχνότερες θέσεις εντόπισής της είναι το άπω λεπτό και το εγγύς παχύ έντερο. Το ήμισυ περίπου των ασθενών έχει νόσο που καταλαμβάνει τόσο τον ειλεό όσο και το εγγύς κόλο ενώ το 1/3 έχει νόσο που περιορίζεται κυρίως

στον τελικό ειλεό και σε λίγες περιπτώσεις και στη νήστιδα. Η μεμονωμένη εντόπιση στη νήστιδα καθώς και η παρουσία της νόσου σε οισοφάγο, στόμαχο ή δωδεκαδάκτυλο είναι εξαιρετικά σπάνια και συσχετίζεται συνήθως με σύγχρονη εντόπιση στο άνω λεπτό έντερο ή στο κόλο. Στο 20% -25% των ασθενών η νόσος προσβάλλει αποκλειστικά το παχύ έντερο. Η φλεγμονή στη νόσο του Crohn εμφανίζει ασυνέχεια σε επίπεδο επιμήκους εντερικού άξονα και μπορεί να αφορά όλους τους χιτώνες του εντερικού τοιχώματος από το βλεννογόνο μέχρι και τον ορογόνο (13,37).

Διαγιγνώσκεται συνήθως σε άτομα ηλικίας 15 – 30 ετών με προοδευτική ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης από αυτή την ηλικιακή ομάδα αν και αναφέρεται και ένα δεύτερο peak εμφάνισης μεταξύ 50 και 70 ετών. Στην ουσία, πάντως, η νόσος μπορεί να διαγνωσθεί οποτεδήποτε από την παιδική ηλικία και καθόλη τη διάρκεια της ζωής, και στις περισσότερες μελέτες αναφέρεται μικρή υπεροχή - στην επίπτωση - των γυναικών έναντι των ανδρών σε αναλογία 1.3 : 1 (13,35).

Τα πρώιμα ιστοπαθολογικά ευρήματα της νόσου είναι τα αφθώδη έλκη, τα οποία αντιστοιχούν σε περιοχές με εστιακή ανοσοδιέγερση, και τα κοκκιώματα τα οποία, παρότι χαρακτηριστικά της νόσου, δεν συνιστούν ούτε μοναδικό αλλά ούτε και σταθερό εύρημα. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά ανεύρεσης κοκκιωμάτων ποικίλλουν σημαντικά από 15% στις ενδοσκοπικές σειρές μέχρι 70% στις χειρουργικές και ανευρίσκονται τόσο σε πάσχον όσο και σε φαινομενικά ανέπαφο έντερο. Σπανιότατα, υπάρχει πιθανότητα να ανευρεθούν και σε θέσεις εκτός του πεπτικού σωλήνα, όπως το δέρμα, οι οφθαλμοί και τη ήπαρ. Ο TNF (παράγοντας νέκρωσης των όγκων) αποτελεί την κυτταροκίνη – κλειδί για το σχηματισμό των κοκκιωμάτων. Ευμεγέθη έλκη (από συνένωση μικροτέρων αφθωδών), αποστήματα, συρίγγια και στενώσεις αποτελούν όψιμα ευρήματα της NC.

Η κλινική εκδήλωση της νόσου ποικίλλει σημαντικά, αφού εξαρτάται από την εντόπισή της, την έκταση της φλεγμονής και την παρουσία εντερικών ή εξωεντερικών επιπλοκών. Παρατηρείται, συνήθως, προσβολή του τελικού ειλεού με συνοδό εμπλοκή και του τυφλού και η νόσος διατρέχει υποκλινικά για αρκετά χρόνια μέχρι την ανάπτυξη ινώδους στένωσης και την εμφάνιση συμπτωμάτων. Κοιλιακό άλγος και διάρροια αποτελούν τις συχνότερες εκδηλώσεις της νόσου ενώ η εμφανής αποβολή αίματος από το ορθό είναι πολύ λιγότερο συχνή σε σύγκριση με την ΕΚ. Με αυξημένη συχνότητα εμφανίζεται επίσης και η περιπρωκτική νόσος, η οποία μάλιστα στο 24% των ασθενών προηγείται των εντερικών εκδηλώσεων 4 κατά μέσο όρο έτη. Η περιπρωκτική NC περιλαμβάνει δερματικές αλλοιώσεις (πχ επιφανειακά έλκη, αποστήματα), βλάβες στον πρωκτικό σωλήνα (έλκη, συρίγγια, στενώσεις) καθώς και περιπρωκτικά συρίγγια. Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις – που αφορούν το 1 / 4 των ασθενών με NC – μπορεί να είναι μυοσκελετικές, βλεννογονοδερματικές, οφθαλμικές, ηπατοχολικές, ουροποιογεννητικές, καρδιαγγειακές, αναπνευστικές ή διαταραχές πήξης. Για την εκτίμηση της δραστηριότητας της νόσου συχνά αρκεί η παρακολούθηση των συμπτωμάτων και σημείων, ενώ έχουν προταθεί και διάφορα συστήματα βαθμολόγησης – αξιολόγησης, εκ των οποίων το CDAI (Crohn's Disease Activity Index) είναι εκείνο που χρησιμοποιείται συνηθέστερα. Άλλου τύπου προσέγγιση αποτελεί η μέτρηση βιολογικών δεικτών της φλεγμονής, όπως η ΤΚΕ και πρωτεΐνες οξείας φάσης πχ CRP ή κυτταροκινών, υποδοχέων κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης στον

ορρό, όπως πχ IL-6, IL-1, διαλυτός υποδοχέας IL-2. Δυστυχώς, όλες αυτές οι δοκιμασίες στερούνται ευαισθησίας και ειδικότητας. Μόνον η απευθείας εκτίμηση της ανοσολογικής εντερικής διέγερσης σε βλεννογονικό δείγμα μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία και ειδικότητα αλλά μειονεκτεί διότι είναι επεμβατική, με μεγάλη μεταβλητότητα και πτωχή τυποποίηση.

Ευαίσθητος και ειδικός δείκτης φλεγμονής του εντερικού βλεννογόνου είναι η ποσοτική εκτίμηση ραδιοσημασμένων λευκών αιμοσφαιρίων στα κόπρανα, η οποία όμως είναι επίπονη και εκθέτει τον ασθενή σε ακτινοβολία. Τελευταία, ευαίσθητο δείκτη εντερικής φλεγμονής φαίνεται ότι αποτελεί η αποβολή καλπροτεκτίνης - η οποία συνιστά πρωτεΐνη των ουδετερόφιλων – και λακτοφερρίνης (σιδηροδεσμευτική γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τις περισσότερες βλεννογονικές μεμβράνες) στα κόπρανα, η οποία μπορεί να υποδείξει υποτροπή νόσου ή μη ανταπόκριση στη θεραπεία.

Η διάγνωση της NC στηρίζεται στο ιστορικό, την κλινική εξέταση, τον εργαστηριακό έλεγχο, την ενδοσκόπηση, τη διάβαση/εντερόκλυση και την κλασική ιστοπαθολογία. Πάραυτα, νεότερες διαγνωστικές τεχνικές, όπως η ενδοσκοπική κάψουλα, η εντεροσκόπηση με διπλό μπαλόνι και η μαγνητική εντερόκλυση παρέχουν καινούργια δεδομένα και διευκολύνουν την πραγματοποίηση ενός ενδεδειχθέντος ελέγχου για τη χαρτογράφηση και τον περαιτέρω χειρισμό της νόσου.

Πρωτεύοντες στόχοι της θεραπείας της NC είναι η επαγωγή και διατήρηση της ύφεσης. Προς επίτευξη των ανωτέρω στόχων, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η βελτίωση των συμπτωμάτων και της ποιότητας ζωής των ασθενών και ως εκ τούτου θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπόψη και οι ανεπιθύμητες συνέπειες της θεραπείας, ιδία της μακροχρόνιας. Το θεραπευτικό οπλοστάσιο περιλαμβάνει αμινοσαλικυλικά, κορτικοστεροειδή, αντιβιοτικά, ανοσοκατασταλτικά και ανοσοτροποποιητικά φάρμακα, ειδική εντερική ή παρεντερική θρέψη και τη χειρουργική θεραπεία για την αντιμετώπιση επιπλοκών ή ανθεκτικών στη φαρμακευτική αγωγή περιπτώσεων – ιδία κορτικο-εξαρτώμενων ασθενών (13).

Η ελκώδης κολίτιδα (ΕΚ) αποτελεί επίσης μια χρόνια φλεγμονώδη νόσο, που διατρέχει με υφέσεις και εξάρσεις άλλοτε άλλης διάρκειας, η οποία όμως, προσβάλλει αποκλειστικά και μόνον το παχύ έντερο.

Η πρώτη φορά που η νόσος αναγνωρίστηκε ως ξεχωριστή οντότητα από τη βακτηριδιακή δυσεντερία ήταν το 1859, από τον ιατρό Samuel Wilks, ο οποίος την περιέγραψε με τον όρο <<απλή ιδιοπαθής κολίτις>>. Έκτοτε, η πρώτη ολοκληρωμένη περιγραφή της νόσου έγινε το 1909 από τον Sir Arthur Hurst, ο οποίος δίνοντας και στοιχεία της ενδοσκοπικής εικόνας της κολίτιδας πέτυχε τη σαφή διαφορική της διάγνωση από τη βακτηριδιακή δυσεντερία.

Η ΕΚ μπορεί να εμφανισθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αν και προσβάλλει κυρίως άτομα ηλικίας 15 – 25 ετών με ένα δεύτερο αναφερόμενο peak εμφάνισης στα 60. Η επίπτωσή της, όπως και της νόσου του Crohn, είναι αυξημένη στους Εβραίους (και ιδιαίτερα στους Εβραίους Ashkenazi) και σε άτομα με υψηλότερο οικονομικό και μορφωτικό επίπεδο παγκοσμίως. Παρατηρείται λιγότερο συχνά σε άτομα Αφροαμερικανικής καταγωγής.

Οι γυναίκες προσβάλλονται το ίδιο συχνά με τους άνδρες (13,35).

Τυπικά, η νόσος άρχεται από το ορθό και επεκτείνεται κατά συνέχεια ιστού - δίχως να αφήνει ανέπαφες περιοχές - σε άλλοτε άλλη έκταση, εντός του παχέος εντέρου με χαρακτηριστική απότομη μετάβαση από τη πάσχουσα στη φυσιολογική περιοχή του εντερικού τοιχώματος. Σπάνια εμφανίζονται εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα, όπως η παρουσία εστιών φλεγμονής στο δεξί κόλο (περισκωληκοειδικά, τυφλό) σε ασθενείς με αριστερή κολίτιδα ή η παρουσία σοβαρότερης νόσου στο δεξί κόλο σε σχέση με το αριστερό - ενίοτε και με φυσιολογικό ορθικό βλεννογόνο - απότοκος συνήθως τοπικής θεραπείας με υπόθετα ή κλύσματα. Η βιοψία ορθού σε αυτές τις περιπτώσεις αποκαλύπτει συνήθως τυπικές ιστολογικές αλλοιώσεις συμβατές με ΕΚ.

Στην ΕΚ, η φλεγμονή εστιάζεται κατά κύριο λόγο στο βλεννογόνο και δεν επεκτείνεται πέραν της βλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας. Εξαιρέση αποτελεί μια μικρή μειοψηφία ασθενών με σοβαρή κεραυνοβόλο νόσο, όπου η φλεγμονή μπορεί να επεκταθεί στον υποβλεννογόνιο ή και στον μυϊκό χιτώνα, και να δώσει την κλινική εικόνα του τοξικού μεγακόλου. Σε ήπια μορφή της νόσου, ο βλεννογόνος εμφανίζεται υπεραιμικός, οιδηματώδης και κοκκιωματώδης χωρίς διαβρώσεις. Με την πρόοδο της κολίτιδας, ο βλεννογόνος καθίσταται αιμορραγικός, εύθρυπτος, με παρουσία μικρών ελκών, τα οποία μπορεί να μεγεθυνθούν και να επεκταθούν βαθύτερα στο χόριο. Τα έλκη αυτά συνήθως είναι ανώμαλα, με επηρμένα χείλη, με παρουσία βλεννοπυώδους υγρού και με γραμμικό τρόπο επέκτασης κατά μήκος των κολικών ταινιών. Σε νόσο με μακρά διάρκεια, το παχύ έντερο χάνει τις φυσιολογικές πτυχές του και γίνεται επίπεδο ενόσω φλεγμονώδεις πολύποδες (ψευδοπολύποδες) κάνουν την εμφάνισή τους στα πλαίσια διάχυτης αναγεννητικής διαδικασίας του επιθηλίου. Οι ψευδοπολύποδες εντοπίζονται στο κόλο κι όχι στο ορθό, γεγονός που δεν έχει διευκρινισθεί αιτιολογικά επί του παρόντος. Σε φάση ύφεσης, ο βλεννογόνος έχει φυσιολογική εμφάνιση, παρότι σε ασθενείς με πολλαπλές εξάρσεις σε βάθος χρόνου συχνά καθίσταται επίπεδος και ατροφικός.

Η χαρακτηριστική ιστολογική βλάβη στην ΕΚ είναι τα αποστημάτια των κρυπτών, τα οποία παρότι χαρακτηριστικά δεν είναι και ειδικά για τη νόσο. Τα αποστημάτια χαρακτηρίζονται από την άθροιση ουδετεροφίλων εντός των κρυπτών, στα τοιχώματα αυτών και στο παρακείμενο χόριο. Άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά συνοδευτικά της ΕΚ είναι η διαταραχή της αρχιτεκτονικής των κρυπτών και η μεταπλασία των κυττάρων Paneth (σε χρονιότητα της νόσου).

Η κλινική εικόνα της ΕΚ εξαρτάται τόσο από την έκταση όσο και από τη σοβαρότητα της νόσου. Κατά προσέγγιση, το 20% των ασθενών εμφανίζει πανκολίτιδα, το 40% - 50% έχει νόσο που περιορίζεται στο ορθοσιγμοειδές και το υπόλοιπο 30% - 40% έχει νόσο που επεκτείνεται πέραν του σιγμοειδούς αλλά δεν καταλαμβάνει όλο το μήκος του εντέρου. Τοιουτοτρόπως, η ΕΚ ορίζεται ως <<ελκώδης ορθίτις>> όταν περιορίζεται στα περιφερικά 10 – 20 cm, <<αριστερή κολίτις>> όταν επεκτείνεται μέχρι τη σπληνική καμπή, <<εκτεταμένη κολίτις>> όταν επεκτείνεται πέραν της σπληνικής καμπής και <<πανκολίτις>> όταν επεκτείνεται πέραν της ηπατικής καμπής ή όταν καταλαμβάνει όλο το έντερο. Η σοβαρότητα της νόσου εκτιμάται με βάση κλινικά, ενδοσκοπικά ή ιστολογικά κριτήρια. Τα κριτήρια των Truelove και Witts είναι τα πλέον εύχρηστα κλινικά κριτήρια, τα οποία κατατάσσουν τη νόσο ως εξής :

- α) ήπια → λιγότερες από 4 κενώσεις ημερησίως, με ή χωρίς πρόσμιξη αίματος, χωρίς συστηματικές διαταραχές και με φυσιολογική ΤΚΕ
- β) μέτρια → περισσότερες από 4 κενώσεις ημερησίως και με ελάχιστον συστηματικές διαταραχές
- γ) σοβαρή → περισσότερες από 6 αιματηρές κενώσεις ημερησίως και με συστηματικές εκδηλώσεις, όπως πυρετός, ταχυκαρδία, αναιμία και ΤΚΕ > 30.

Ένα σύστημα ενδοσκοπικής ταξινόμησης της μακροσκοπικής εικόνας του βλεννογόνου που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη είναι το εξής :

- 0 → φυσιολογικός βλεννογόνος
- 1 → μη ορατό αγγειακό δίκτυο
- 2 → κοκκιωματώδης, μη εύθρυπτος βλεννογόνος
- 3 → προκλητή ευθρυπτότητα
- 4 → αυθόρμητη αιμορραγία, εξέλκωση.

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά μεταβάλλονται συνήθως πολύ πιο αργά σε σύγκριση με τα ενδοσκοπικά ή τα κλινικά, κι ως εκ τούτου η ιστολογική εκτίμηση δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον καθορισμό της θεραπείας. Με βάση ιστολογικά κριτήρια, η φλεγμονή κατηγοριοποιείται ως : μη σημαντική, ήπια – μέτρια, σοβαρή.

Τα κύρια συμπτώματα της ΕΚ είναι η διάρροια, η αποβολή αίματος και βλεννοπυώδους εκκρίματος από το ορθό, το κοιλιακό άλγος, η επείγουσα ανάγκη για κένωση και ο τεινεσμός. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών προσέρχεται μόνον με διάρροια ή αιμορραγία από το ορθό. Πυρετός και απώλεια βάρους παρατηρούνται στο ένα τρίτο των ασθενών ενώ ένα 15% - 25% έχουν εξωεντερικές εκδηλώσεις (πχ οφθαλμικές, δερματικές, αρθρικές, ηπατοχολικές, θρομβοεμβολικές). Η σοβαρότητα, συνήθως, των συμπτωμάτων συμβαδίζει με τη σοβαρότητα της νόσου (13,37).

Η αντικειμενική εξέταση ασθενών με ήπια νόσο είναι συνήθως φυσιολογική, με εξαίρεση μια ήπια ευαισθησία στον αριστερό λαγόνιο βόθρο. Σε σοβαρή, όμως, νόσο οι ασθενείς εμφανίζουν συστηματικά σημεία τοξικότητας ή υποογκαιμίας, όπως πυρετό, ταχυκαρδία, απώλεια βάρους ή έντονη κοιλιακή ευαισθησία. Το τοξικό megacolon, μια σπάνια (λιγότερο από 2% των ασθενών) και απειλητική για τη ζωή επιπλοκή της ΕΚ, χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα που αγγίζει το 15% - 50% των ασθενών.

Συνήθως παρατηρείται σε ασθενείς με πανκολίτιδα και μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε φάση της νόσου – με συχνότερη επίπτωση στα πρώιμα στάδια αυτής. Εκδηλώνεται με σημεία τοξικής κολίτιδας (πυρετός, ταχυσφυγμία, κοιλιακή διάταση, σημεία εστιακής ή γενικευμένης περιτονίτιδας), με λευκοκυττάρωση και διάταση του κόλου > 6cm στην απλή ακτινογραφία κοιλίας.

Πλην του τοξικού megacolons, άλλες σπάνιες επιπλοκές της ΕΚ είναι η διάτρηση (σε σοβαρή κολίτιδα), η στένωση (ύποπτη για κακοήθεια), η μαζική αιμορραγία και η ανάπτυξη καρκίνου για την οποία θα γίνει λόγος στη συνέχεια (37).

Η διάγνωση της ΕΚ θα στηριχθεί στην κλινική εικόνα – και κυρίως στο ιστορικό – στην ενδοσκοπική εικόνα και στην ιστολογική εκτίμηση του βιοπτικού υλικού από το παχύ έντερο. Χρήσιμος, για τη διαφορική διάγνωση από λοιμώδη αίτια κολίτιδας είναι ο έλεγχος κοπράνων, κυρίως μέσω καλλιιεργειών.

Η θεραπεία, που στοχεύει στην επίτευξη και τη διατήρηση της ύφεσης στηρίζεται κυρίως στα κορτικοστεροειδή και τα παράγωγα του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος, τα

οποία χορηγούνται σε διάφορες μορφές και δοσολογίες ανάλογα με την εντόπιση της νόσου. Συνήθως, γίνεται αρχικά χρήση κορτικοειδών για έλεγχο της ενεργότητας της νόσου (λόγω της μεγαλύτερης αποτελεσματικότητάς τους) και στη συνέχεια σταδιακή διακοπή αυτών και χρήση των αμινοσαλικυλικών για τη διατήρηση της ύφεσης. Σε δυσχέρεια επίτευξης ύφεσης με τα κορτικοειδή ή διατήρησης αυτής με τα αμινοσαλικυλικά, και προς αποφυγή των σοβαρότατων ανεπιθύμητων ενεργειών της χρόνιας χρήσης των κορτικοειδών, μπορεί να χορηγηθούν ανοσοκατασταλτικοί (πχ αζαθειοπρίνη, 6-MP, κυκλοσπορίνη) ή ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες (πχ infliximab) πριν την καταφυγή στη χειρουργική αντιμετώπιση (ολική κολεκτομή).

4. ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ως πολύποδας ορίζεται μια ευδιάκριτη ιστική μάζα που προβάλλει εντός του εντερικού αυλού. Ο χαρακτηρισμός ενός πολύποδα βασίζεται στη μακροσκοπική του εμφάνιση με έμφαση στις διαστάσεις του, στην παρουσία ή απουσία μίσχου, και στο εάν είναι μονήρης ή συνυπάρχουν παρόμοιες βλάβες σε άλλες θέσεις του εντερικού σωλήνα. Ανεξάρτητα, πάντως, από αυτά τα χαρακτηριστικά, ο σαφής καθορισμός τους έγκειται στην ιστολογική τους ταυτότητα.

Λόγω της ενδοαυλικής τους πρόπτωσης δέχονται πιέσεις από το μετακινούμενο κοπρανώδες υλικό με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπτωμάτων: εξέλκωση και αιμορραγία, κοιλιακό άλγος λόγω περισταλτικής περιφερικής προώθησης του πολύποδα ή σπανιότερα αποφρακτικά φαινόμενα από ευμεγέθεις βλάβες. Η παρουσία συμπτωμάτων, πάραυτα, είναι σπάνια και το ενδιαφέρον όσον αφορά τους πολύποδες εστιάζεται κυρίως στην πιθανότητα τους να εξελιχθούν σε κακοήθεια.

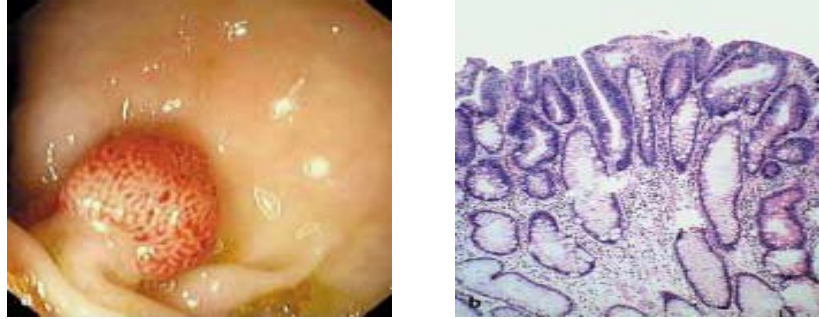
Ιστολογικά, οι πολύποδες ταξινομούνται σε νεοπλασματικούς (αδενώματα και καρκινώματα) και σε μη νεοπλασματικούς (πίνακας 2). Τα αδενώματα και τα καρκινώματα έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τους την κυτταρική δυσπλασία. Υποβλεννογόνιες βλάβες έχουν, επίσης, πολυποειδή εμφάνιση.

Πίνακας 2. Ταξινόμηση πολυπόδων του παχέος εντέρου (Feldman M, Friedman L, Brandt L. Sleisinger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Diseases 2010. 9th ed.)

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΟΛΥΠΟΔΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ
<p>Νεοπλασματικοί βλεννογονικοί</p> <p><u>Καλοήθεις</u> Οδοντωτοί Σωληνώδεις Σωληνοθηλώδεις Θηλώδεις</p> <p><u>Κακοήθεις (καρκίνοι)</u> Μη διηθητικοί Καρκίνωμα in situ Ενδοβλεννογόνοι Διηθητικοί</p>
<p>Μη νεοπλασματικοί βλεννογονικοί</p> <p>Υπερπλαστικοί Βλεννογονικοί πολύποδες Νεανικοί Peutz-Jeghers Φλεγμονώδεις</p>
<p>Υποβλεννογόνιες βλάβες</p> <p>Εν τω βάθει κυστική κολίτις Κυστοειδής πνευμάτωση του κόλου Λεμφοειδείς πολύποδες (καλοήθεις & κακοήθεις) Λιτώματα Καρκινοειδή Μεταστατικά νεοπλάσματα Άλλες αλλοιώσεις</p>

4A) Νεοπλασματικοί πολύποδες

Τα αδενώματα είναι όγκοι από καλοήθεις νεοπλασματικό επιθήλιο. Μακροσκοπικά, μπορεί να είναι άμισχοι (προσκολλημένοι με ευρεία βάση στο εντερικό τοίχωμα) ή μισχωτοί (προσκολλημένοι με μίσχο στο εντερικό τοίχωμα). Ιστολογικά, με βάση την αρχιτεκτονική των αδενίων τους διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες: σωληνώδη, λαχνωτά και σωληνολαχνωτά. Τα σωληνώδη χαρακτηρίζονται από ένα δίκτυο διακλαδιζόμενων αδένων σε ποσοστό 80% ενώ στα λαχνωτά οι αδένες εκτείνονται σε ευθεία γραμμή από την επιφάνεια προς το κέντρο του πολύποδα δημιουργώντας επιμήκεις, δακτυλιοειδείς προσεκβολές σε ποσοστό, επίσης, 80%. Τα σωληνολαχνωτά αδενώματα συνδυάζουν χαρακτηριστικά των δύο ιστολογικών τύπων. Το 80% - 86% των αδενωμάτων είναι σωληνώδους τύπου, το 3% - 16% λαχνωτού και το 8% - 16% σωληνολαχνωτά.



Εικόνα 9. Ενδοσκοπική και ιστολογική εικόνα σωληνώδους αδενώματος του παχέος εντέρου (Rubio CA, Jaramillo E et al. Classification of colorectal polyps: Guidelines for the endoscopist. Endoscopy 2002; 34: 226-36)

Εξ ορισμού, όλα τα αδενώματα επιδεικνύουν δυσπλασία. Το αδενωματώδες επιθήλιο χαρακτηρίζεται από ανώμαλη κυτταρική ανανέωση και διαφοροποίηση με αποτέλεσμα παρουσία υπερπληθυσμών κυττάρων στις εντερικές κρύπτες τα οποία αποκτούν υπερχρωματικούς, επιμηκυμένους πυρήνες σε <<δίκην παλουκίων>> διάταξη και βλεννίνη σε διάφορες ποσότητες στο εσωτερικό τους. Η δυσπλασία διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: ήπια, μέτρια και σοβαρή. Η περαιτέρω εξέλιξη από τη σοβαρή δυσπλασία χαρακτηρίζεται ως καρκίνωμα in situ, ενώ πολλοί παθολογοανατόμοι κατατάσσουν αυτές τις δύο οντότητες μαζί υπό τον κοινό όρο υψηλόβαθμη δυσπλασία. Στην πράξη, η δυσπλασία κατηγοριοποιείται σε : χαμηλόβαθμη – που περιλαμβάνει την ήπια και μέτρια δυσπλασία – και σε υψηλόβαθμη, η οποία περιλαμβάνει τη σοβαρή δυσπλασία και το καρκίνωμα in situ. Στο καρκίνωμα in situ, η βασική μεμβράνη που περιβάλλει τους αδένες παραμένει άθικτη ενώ στην περίπτωση που νεοπλασματικά κύτταρα τη διαπεράσουν και εισέλθουν στο χόριο η βλάβη ορίζεται πλέον ως ενδοβλεννογονικό καρκίνωμα. Και στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις καρκινωμάτων οι βλάβες δεν έχουν μεταστατικό χαρακτήρα αφού τα λεμφαγγεία στον βλεννογόνο βρίσκονται υπό τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, και γι' αυτό το λόγο οι δύο αυτές βλάβες αναφέρονται συλλήβδην ως <<μη διηθητικό καρκίνωμα>>. Όταν νεοπλασματικά κύτταρα διαπεράσουν τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, η βλάβη καλείται <<διηθητικό καρκίνωμα>> και το αδένωμα που φέρει εστία διηθητικού καρκινώματος <<κακοήθης πολύποδας>>. Υψηλότεροι βαθμοί δυσπλασίας ανευρίσκονται συνήθως σε αδενώματα με μεγαλύτερο μέγεθος και λαχνωτό ιστολογικό τύπο, τα οποία έχουν και μεγαλύτερη πιθανότητα να περιέχουν εστίες διηθητικού καρκίνου. Τα τρία βασικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν την πιθανότητα να φιλοξενεί κακοήθεια ένας πολύποδας είναι το μέγεθος, ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός δυσπλασίας του.

Ως προς το μέγεθος, τα αδενώματα ταξινομούνται σε: <1cm, 1 - 2cm και >2cm. Πολύποδες με διάμετρο < 5mm, χαρακτηρίζονται ως μικροσκοπικοί και παρότι ανευρίσκονται εξαιρετικά συχνά κατά τη διάρκεια των ενδοσκοπήσεων έχουν μικρή βιολογική και κλινική σημασία, αφού παρότι το 30% - 50% αυτών είναι αδενωματώδεις, <1% έχουν λαχνωτό ιστολογικό τύπο ή περιέχουν εστία σοβαρής δυσπλασίας ενώ δεν έχουν σχεδόν ποτέ χαρακτήρα διηθητικού καρκινώματος. Σε γενικές γραμμές, μεγαλύτερες πιθανότητες κακοήθους εξαλλαγής έχουν οι πολύποδες

με μεγαλύτερο μέγεθος, λαχνωτό κυρίως ιστολογικό τύπο και μεγαλύτερο βαθμό δυσπλασίας. Η πιθανότητα, π.χ., ένα αδένωμα <1cm να έχει εστία καρκίνου είναι 1,3%, όμως αυτή ανέρχεται στο 10% – 27% όταν ο πολύποδας είναι κατά κύριο λόγο λαχνωτός ή εμφανίζει σοβαρή δυσπλασία.

Άλλες κατηγορίες αδενωμάτων είναι τα επίπεδα αδενώματα, τα οδοντωτά αδενώματα και οι ανώμαλες κρύπτες (aberrant crypts).

Μακροσκοπικά, τα επίπεδα αδενώματα μπορεί να είναι εντελώς επίπεδα, ελαφρώς υπεργεμένα ή με κεντρική εμβύθιση. Λόγω του μικρού μεγέθους τους - <1cm συνήθως – εύκολα διαφεύγουν της προσοχής κατά τη διάρκεια μιας τυπικής κολοσκόπησης, γεγονός που οδήγησε στην ανεύρεση και χρησιμοποίηση πλέον εξελιγμένων τεχνικών ενδοσκόπησης (χρωμοενδοσκόπηση, μεγεθυντική ενδοσκόπηση) για τον εντοπισμό τους. Το μοντέλο εξέλιξής τους δεν είναι πλήρως διευκρινισμένο. Φαίνεται ότι εξελίσσονται σε τυπικά πολυποειδή αδενώματα παρότι αρκετές μελέτες έχουν δείξει αυξημένη επίπτωση υψηλόβαθμης δυσπλασίας σε μικρές επίπεδες βλάβες και χαμηλή επίπτωση *k-ras* μεταλλάξεων σε αυτές σε σύγκριση με πολυποειδείς βλάβες, στοιχεία που δείχνουν πιθανόν ότι η κακοήθης εξέλιξη δεν περνά απαραίτητα από στάδιο πολύποδα (13).

Ο όρος οδοντωτά αδενώματα προτάθηκε το 1990 από τους Fenoglio-Preiser και Longacre για την περιγραφή πολυπόδων με μικτά χαρακτηριστικά υπερπλαστικών και αδενωματωδών. Αποτελούν το 13% περίπου των υπερπλαστικών πολυπόδων και έχουν συνήθως μεγαλύτερο μέγεθος, κυτταρικές ατυπίες, μιτώσεις στην ανώτερη ζώνη των κρυπτών και ενίοτε εστίες δυσπλασίας ή καρκίνου. Τα βασικά χαρακτηριστικά αυτών των πολυπόδων είναι οι πριονωτού τύπου αναδιπλώσεις του επιθηλίου των εντερικών κρυπτών, αποτέλεσμα της ελαττωμένης απόπτωσης και της καθυστέρησης της μετανάστευσης των κυττάρων από την κρύπτη προς την επιφάνεια (13,38,39).

Από το 2005, οι οδοντωτοί πολύποδες – με βάση στοιχεία που προέκυψαν από μελέτες – έχουν κατηγοριοποιηθεί ως εξής: υπερπλαστικοί, άμισχα οδοντωτά αδενώματα, κλασσικά οδοντωτά αδενώματα και μικτά οδοντωτά αδενώματα. Η κατηγοριοποίηση στηρίχθηκε κυρίως στα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που εμφανίζουν οι πολύποδες και που αφορούν κυρίως την αρχιτεκτονική και την κυτταρική σύνθεση των κρυπτών.

Σύμφωνα με στοιχεία που προκύπτουν και δημοσιεύονται συνεχώς, οι οδοντωτοί πολύποδες, και δη τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα, αποτελούν πρόδρομες βλάβες που οδηγούν σε καρκινώματα με σποραδική μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Μέχρι σήμερα, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος όσον αφορά τον καθορισμό του μοριακού παθογενετικού μηχανισμού των οδοντωτών πολυπόδων και των σχέσεων που έχουν με συγκεκριμένες υποκατηγορίες ΚΠΕ, με εξέχουσα θέση να έχει η ανακάλυψη της μετάλλαξης του ογκογονιδίου BRAF και ο φαινότυπος του μεθυλιωτή των CpG νησιδίων (CIMP). Το DNA μπορεί να μεθυλιωθεί με την προσθήκη μιας μεθυλομάδας σε μια βάση κυτοσίνης κι επειδή με αυτό τον τρόπο η αλληλουχία βάσεων στο DNA δεν μεταβάλλεται, αυτή η μεταβολή θεωρείται επιγενετική κι όχι γενετική. Ο συνδυασμός ενός νουκλεοτιδίου κυτοσίνης να ακολουθείται από ένα νουκλεοτίδιο γουανίνης (CpG δινουκλεοτίδιο) είναι ασυνήθης στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Πάραυτα, CpG νησίδια, δηλαδή αθροίσεις CpG δινουκλεοτιδίων, ανευρίσκονται στις προαγωγές ζώνες του

ημίσεος περίπου των γονιδίων. Η παθολογική υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων σχετίζεται με μετατροπή γονιδίων που κωδικοποιούν καταστολείς των όγκων σε σιωπηρά, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Η υπερμεθυλίωση του MLH1 αποτελεί την κύρια αιτία μικροδορυφορικής αστάθειας στους σποραδικούς καρκίνους. Ο CIMP έχει παρατηρηθεί σε οδοντωτά αδενώματα, και συχνότερα στα άμισχα του (ΔΕ) κόλου. Η δημιουργία μιας απλής, σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο BRAF έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οδού της μιτογόνου πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), μέσω της οποίας ενεργοποιείται και η KRAS, γεγονότα που οδηγούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αναστολή της απόπτωσης. Μετάλλαξη του γονιδίου BRAF παρατηρείται στην πλειοψηφία των SSA αλλά σχεδόν ποτέ στα κλασσικά αδενώματα ούτε όμως και στον κληρονομικό μη πολυποδιασικό ΚΠΕ (HNPCC), γεγονός που δείχνει συσχέτιση με την οδοντωτή οδό παρά με την MSI (38).

Οι ανώμαλες κρύπτες, οι οποίες ανευρίσκονται σε μακροσκοπικά φυσιολογικό βλεννογόνο, μπορεί να εμφανίζονται μεμονωμένα ή ως μικρές εστίες. Καθίστανται αντιληπτές κυρίως μέσω των εξελιγμένων μεθόδων ενδοσκόπησης (πχ χρωμοενδοσκόπηση). Σε μελέτες σε πειραματόζωα, έχουν αποτελέσει χρήσιμους βιολογικούς δείκτες καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και χημειοπροφύλαξης. Στον άνθρωπο, οι ανώμαλες κρύπτες είναι συνήθως υπερπλαστικές ενώ η παρουσία δυσπλαστικών κρυπτών αντιπροσωπεύει πιθανόν την πρωιμότερα ανιχνεύσιμη προκαρκινική βλάβη.

Η συχνότητα εμφάνισης αδενωμάτων του παχέος εντέρου ποικίλει στους διαφόρους πληθυσμούς, και φαίνεται ότι είναι μεγαλύτερη σε εκείνους με υψηλότερο κίνδυνο για ΚΠΕ. Σε πληθυσμούς με χαμηλό κίνδυνο για ΚΠΕ, η επίπτωση των αδενωμάτων μετά βίας αγγίζει το 12% ενώ σε εκείνους με μεσαίο ή υψηλό κίνδυνο μπορεί να φθάσει το 30% - 60%. Η επίπτωση είναι μεγαλύτερη σε πιο προχωρημένες ηλικίες – ιδίως > 60 ετών – και σε άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό αδενωμάτων ή ΚΠΕ.

Τα αδενώματα του παχέος εντέρου είναι συνήθως ασυμπτωματικά. Συμπτώματα που έχουν σχετισθεί με την παρουσία πολυπόδων είναι κυρίως η διαλείπουσα απώλεια αίματος από το ορθό αλλά και η διάρροια, η δυσκοιλιότητα και κολικοειδή κοιλιακά άλγη στην κατώτερη κοιλία. Τα περισσότερα εξ αυτών παρατηρούνται στις περιπτώσεις ευμεγεθών βλαβών ενώ ένα σπάνιο σύνδρομο εκκριτικού τύπου διάρροιας έχει σχετισθεί με την ύπαρξη λαχνωτών αδενωμάτων με διάμετρο > 3mm ή 4mm στην περιοχή του ορθού – ορθοσιγμοειδούς (13).

Η πολυποδίαση του παχέος εντέρου είναι συνήθως κλινικά σιωπηρή κι έτσι η διάγνωση των αδενωμάτων γίνεται είτε τυχαία κατά τη διάρκεια προληπτικού ελέγχου για ΚΠΕ, είτε για διερεύνηση συμπτωμάτων σχετικών με το παχύ έντερο ή στα πλαίσια διερεύνησης σιδηροπενικής αναιμίας. Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για αυτό το λόγο είναι μέθοδοι ανίχνευσης αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα (FOBΤ), η εξέταση με βάριο (βαριούχος υποκλυσμός) και η ενδοσκόπηση (σιγμοειδοσκόπηση, κολοσκόπηση) ενώ νεότερες μέθοδοι όπως η μεγεθυντική χρωμοενδοσκόπηση, η NBI κολονοσκόπηση, η εικονική κολοσκόπηση και ενδοσκοπική κάψουλα χρησιμοποιούνται για βελτιστοποίηση της κλινικής ανίχνευσης ή σε περιπτώσεις όπου η διενέργεια ή η ολοκλήρωση της ενδοσκόπησης είναι αδύνατη (εικόνα 9). Η εικονική κολοσκόπηση, η απεικόνιση δηλαδή, του παχέος εντέρου με αξονική ή μαγνητική τομογραφία και εν

συνεχεία ανασύνθεση / ανάλυση των εικόνων με ειδικά προγράμματα λογισμικού εμφανίζει ακρίβεια η οποία εξαρτάται από το μέγεθος της εκάστοτε βλάβης. Συγκεκριμένα, είναι πιο ακριβής για βλάβες μεγαλύτερες των 10mm σε σχέση με βλάβες μικρότερες των 5mm. Ως εκ τούτου, χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ακρίβεια στην ανίχνευση καρκίνων παρά αδενωμάτων διότι τα καρκινώματα έχουν συνήθως μεγαλύτερο μέγεθος (40).

Η κολonosκόπηση με βιντεοκάψουλα από την άλλη, κατά την οποία ο ασθενής καταπίνει μια βιντεοκάψουλα η οποία εκπέμπει σε συνεχή βάση εικόνες σε δέκτη-καταγραφέα που φέρει ο ίδιος στη ζώνη του, βρίσκεται σε φάση κλινικών μελετών για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητάς της ως εργαλείου ανίχνευσης. Η μεγεθυντική χρωμοενδοσκόπηση, η NBI κολonosκόπηση, καθώς και η εξέταση του DNA των κοπράνων δεν έχουν αναπτυχθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να αποτελέσουν εξετάσεις ρουτίνας. Σήμερα, η ανίχνευση των πολυπόδων του παχέος εντέρου στηρίζεται κυρίως στην ενδοσκόπηση και τη λήψη βιοψιών. Η αποτελεσματικότητα της ενδοσκόπησης ως μεθόδου διάγνωσης πολυπόδων / καρκίνου του παχέος εντέρου έχει αξιολογηθεί με βάση κάποιους ποιοτικούς δείκτες, όπως ο βαθμός εντερικής προετοιμασίας, η χρονική διάρκεια της εξέτασης, η ολοκλήρωση της εξέτασης, η περιγραφή των βασικών ευρημάτων, η μέθοδος πολυποδεκτομής κλπ. Ο χρόνος απόσυρσης του οργάνου (μέσος χρόνος από το τυφλό έως το ορθό χωρίς τη διενέργεια πολυεκτομής ή λήψης βιοψίας) αποτελεί έναν επιπλέον δείκτη: οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο χρόνος (> 6 min) τόσο υψηλότερο είναι το ποσοστό ανίχνευσης αδενωμάτων (13,41).

4B) Μη νεοπλασματικοί πολύποδες

α) βλεννογονικοί. Ιστολογικά αποτελούνται από φυσιολογικό βλεννογόνο και η ανεύρεσή τους κατά τη διάρκεια μιας ενδοσκόπησης δεν έχει κλινική σημασία.
β) νεανικοί. Αποτελούνται κυρίως από περίσσεια χορίου και διατεταμένους κυστικούς αδένες σε αντίθεση με τους αδενωματούδεις και τους υπερπλαστικούς όπου υπάρχει υπερπληθώρα επιθηλιακών κυττάρων. Κατατάσσονται στα αμαρτώματα και αποτελούν επίκτητες βλάβες αφού κάνουν την εμφάνισή τους στην ηλικία του 1 έως 7ετών. Σπανιότερα ανευρίσκονται σε ενήλικες. Συνήθως εμφανίζονται ως μονήρεις και επηρμένες βλάβες με μέγεθος από 3mm έως 2cm. Λόγω της συχνής εντόπισής τους στο ορθό, της ύπαρξης μίσχου και της άφθονης αγγείωσης, μπορεί να εκδηλωθούν με αιμορραγία ή πρόπτωση και για αυτό το λόγο επιβάλλεται η αφαίρεσή τους. Όταν είναι μονήρεις η πιθανότητα κακοήθειας είναι ανύπαρκτη. Στην περίπτωση, όμως, που είναι πολλαπλοί, υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου, λόγω της ύπαρξης αδενωματούδους επιθηλίου σε κάποιους από αυτούς ή της συνύπαρξης αδενώματος (13).

γ) υπερπλαστικοί. Τυπικά, αποτελούν μικρές (< 5mm σε διάμετρο), άμισχες ή ελαφρώς επηρμένες βλεννογονικές βλάβες, με συχνότερη εντόπιση το (AP) κόλο και το ορθό. Παρατηρούνται, συχνότερα, την 5^η και 6^η δεκαετία της ζωής, σε αντίθεση με τα αδενώματα που κάνουν την εμφάνισή τους συχνότερα την 6^η και 7^η δεκαετία. Ιστολογικά, έχουν μια υπερώριμη εμφάνιση με ανώμαλα οδοντωτή ενδοαυλική επιφάνεια.

Σε μοριακό επίπεδο, η ανώμαλη διατήρηση του επιφανειακού επιθηλίου ενός υπερπλαστικού πολύποδα οφείλεται στην αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης). Η αναστολή της απόπτωσης διευκολύνει την επέλευση γενετικής αστάθειας. Με βάση πρόσφατες έρευνες, οι υπερπλαστικοί πολύποδες αποτελούν κλωνικές αυξήσεις του επιθηλίου με υποκείμενες γενετικές μεταβολές που αφορούν κυρίως τα ογκογονίδια *KRAS* και *BRAF*. Η μετάλλαξη του *KRAS* γονιδίου συνδέεται με αναστολή της απόπτωσης. Χαρακτηρίζονται, επίσης, κι από υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων(CIMP). Σε σχετικά πρόσφατη δημοσιευθείσα μελέτη, οι σποραδικοί υπερπλαστικοί πολύποδες ήταν CIMP αρνητικοί ενώ στο 43% των πολλαπλών/μεγάλων υπερπλαστικών πολυπόδων ή σε υπερπλαστική πολυποδίαση υπήρχε CIMP σε μεγάλο βαθμό. CIMP όμως υπάρχει και σε κλασικά οδοντωτά αδενώματα του (ΔΕ) κόλου. Τέτοια ευρήματα θέτουν την πιθανότητα για τους υπερπλαστικούς πολύποδες να αποτελούν την αρχέγονη βλάβη στην εξελικτική διαδικασία από οδοντωτό πολύποδα σε νεοπλασία, οδηγώντας στην πορεία στη δημιουργία οδοντωτών πολυπόδων και τελικά ΚΠΕ. Επιπρόσθετα, παρότι οι υπερπλαστικοί πολύποδες του (ΔΕ) κόλου συνδέονται ιστογενετικά με την κατηγορία των ΚΠΕ με υψηλά επίπεδα MSI, υπερμεθυλίωσης του DNA ή και τα δύο, οι περισσότεροι δεν θα εξελιχθούν σε κακοήθειες, κι ως εκ τούτου η ενδοσκοπική εξαίρεση μικρών υπερπλαστικών βλαβών από το (ΔΕ) κόλο ηλικιωμένων ασθενών δεν έχει σημαντικό όφελος (42).

δ) φλεγμονώδεις (ψευδοπολύποδες). Παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της αναγεννητικής φάσης μιας φλεγμονής. Σχηματίζονται σε έδαφος βαθέων επιθηλιακών εξελκώσεων, η επούλωση των οποίων γίνεται μέσω μιας αναγεννητικής διαδικασίας που εγκαταλείπει ανώμαλες πολυποειδείς δομές. Λαμβάνουν, ενίοτε, πολύ μεγάλο μέγεθος ομοιάζοντας με νεοπλασματικές βλάβες. Ιστολογικά, σε πρώιμες φάσεις, αποτελούνται από φλεγμονώδη στοιχεία με αφθονία κοκκιωματώδους ιστού ενώ μεταγενέστερα δεν διαφέρουν από το φυσιολογικό βλεννογόνο. Κάθε μορφή σοβαρής κολίτιδας (πχ ΙΦΝΕ, αμοιβαδική κλπ) μπορεί να σχετισθεί με την εμφάνιση βλεννογονικών πολυπόδων, οι οποίοι παρότι δεν εγκυμονούν κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής, αναπτύσσονται εντούτοις σε έδαφος νόσων του παχέος εντέρου (ΙΦΝΕ, σχιστοσωμίαση) με αυξημένο κίνδυνο για ΚΠΕ – εξ ου και η ανάγκη διάκρισής τους από νεοπλασματικές βλάβες (43).

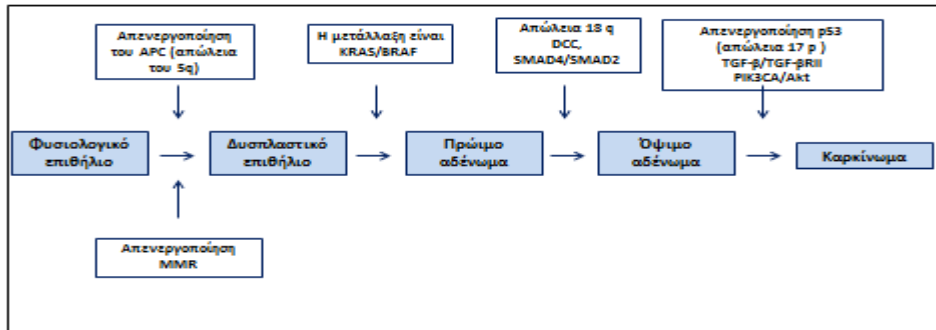
5. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου συνιστά το 11% - 17% όλων των νεοεμφανιζόμενων περιπτώσεων καρκίνου διεθνώς. Με βάση την επίδραση της κληρονομικότητας και τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες: α) τον σποραδικό καρκίνο (περίπου 60% των περιπτώσεων), που περιλαμβάνει ασθενείς χωρίς αξιοσημείωτο οικογενειακό ιστορικό και εξ ορισμού χωρίς κάποια αναγνωρίσιμη κληρονομούμενη γενετική μετάλλαξη που να επισπεύδει την ανάπτυξη καρκίνου β) οικογενή καρκίνο (κατά προσέγγιση 30% των περιπτώσεων), όπου οι ασθενείς έχουν τουλάχιστον ένα συγγενή εξ αίματος με ΚΠΕ ή αδένωμα, αλλά χωρίς κάποια μετάλλαξη της βλαστικής σειράς (germline) ή σαφές μοντέλο κληρονομικότητας και γ) κληρονομικά σύνδρομα ΚΠΕ (10% των περιπτώσεων), τα οποία προκύπτουν από κληρονομική μεταβίβαση μιας μονήρους μετάλλαξης γονιδίων με υψηλή διεισδυτικότητα για καρκίνο (44).

Όπως είναι γνωστό, η νεοπλασία είναι αποτέλεσμα της διαταραχής των κυριότερων μηχανισμών που ρυθμίζουν τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη. Σε κυτταρικό επίπεδο, η ανάπτυξη καθορίζεται από την ισορροπία του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της γήρανσης και του προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων (13).

Σε επίπεδο μοριακής γενετικής, ο καρκίνος του παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από μια πολυσταδιακή διαδικασία εξέλιξης, η οποία είναι από τις καλύτερα κατανοηθείσες στην ογκολογία (14). Θεωρείται ότι, καρκινογόνοι παράγοντες, εισερχόμενοι στον εντερικό αυλό, και σε αλληλεπίδραση με άλλους ενδοαυλικούς, πχ χολικά οξέα, ασκούν τη βλαπτική επίδρασή τους σε επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Τα κύτταρα αυτά πρέπει να εμφανίζουν γενετική προδιάθεση (είτε μέσω κληρονομικότητας ή μέσω γενοτοξικών διαδικασιών) και επαγωγή προς πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα να περνούν σταδιακά στην αθανατοποίηση και στην ανεξέλεγκτη αύξηση (13,40).

Η διαδικασία καρκινογένεσης στο παχύ έντερο αναφέρεται ως (αλληλουχία) εξέλιξη από πολύποδα σε καρκίνο και ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί μια τέτοια διαδικασία είναι κατά προσέγγιση 8 – 12 χρόνια. Το γενετικό μοντέλο αυτής της καρκινικής νόσου αποδίδεται στο σχήμα 1. Τα σημεία κλειδιά αυτού του μοντέλου είναι : 1) η κατόπιν μετάλλαξης ενεργοποίηση ογκογονιδίων ομού με την αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων κατέχουν κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη ΚΠΕ 2) η ύπαρξη μεταλλάξεων σε τουλάχιστον 4 – 5 γονίδια είναι απαραίτητη ώστε να αναπτυχθεί ΚΠΕ 3) η συνολική άθροιση γενετικών μεταλλάξεων σε αντίθεση με τη συγκεκριμένη σειρά που έχει η μία προς την άλλη 4) μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια ασκούν βιολογική δράση έστω κι αν βρίσκονται σε ετερόζυγο κατάσταση (45). Στις περιπτώσεις της οικογενούς αδενωματοδούς πολυποδίασης ή του κληρονομικού μη πολυποδιασικού καρκίνου του παχέος εντέρου – που συνιστούν τις δυο κυριότερες μορφές κληρονομικού ΚΠΕ – η διαδικασία μετάβασης από πολύποδα σε καρκίνο εμφανίζει χρονικά σημαντική επιτάχυνση.



Σχήμα 1. γενετικό μοντέλο για τον καρκίνο του παχέος εντέρου {Saif Wasif M, Chu E. Biology of Colorectal Cancer. The Cancer Journal 2010; 16(3): 196-201}

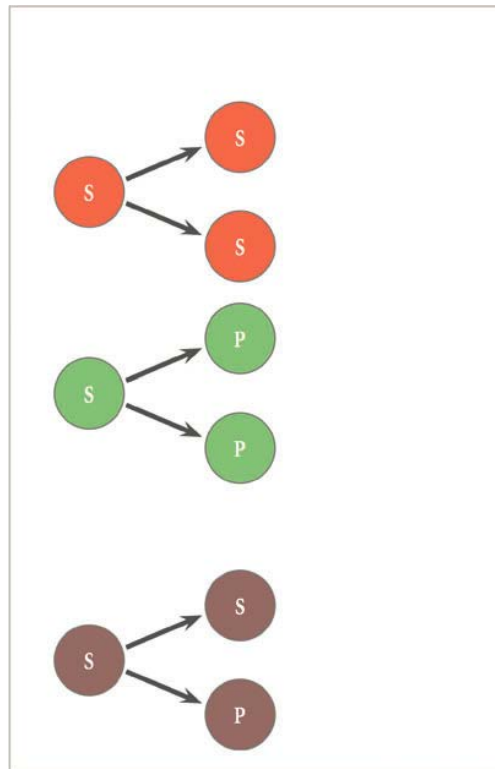
5A) Προγονικά κύτταρα (stem cells) – ανώμαλος κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Το παχύ έντερο είναι ένα όργανο με αξιοσημείωτη ικανότητα πολλαπλασιασμού όσον αφορά το επιθήλιό του, το οποίο αντικαθίσταται κάθε 5 ημέρες ή αλλιώς 6 φορές συχνότερα σε σύγκριση με το ενδομήτριο κατά τη διάρκεια ενός μηνιαίου εμμηνορρυσιακού κύκλου. Από ιστολογική άποψη, το επιθήλιο του παχέος εντέρου αποτελείται από μια στιβάδα κυλινδρικών κυττάρων η οποία με καταδύσεις της εντός του χορίου σχηματίζει σωληνοειδείς δομές, τις κρύπτες του Lieberkuhn, έκαστη των οποίων αποτελείται από 2000 – 3000 κύτταρα. Καθώς το ανθρώπινο παχύ έντερο έχει κατά προσέγγιση 14000 κρύπτες/cm², μήκος 1,5m και περίμετρο περίπου 20cm, εκτιμάται ότι το επιθήλιό του αποτελείται από 100 δισεκατομμύρια κύτταρα. Με δεδομένο το ρυθμό ανανέωσης των εντερικών κυττάρων, υπολογίζεται ότι παράγονται περί τα 6x10¹⁴ κύτταρα καθόλη τη διάρκεια ζωής ενός ανθρώπου. Θα μπορούσε, λοιπόν, κανείς να υποθέσει ότι η αυξημένη επίπτωση που εμφανίζει ο ΚΠΕ οφείλεται στον ταχύ ρυθμό ανανέωσης των κυττάρων του, αφού η μεταλλαξιγένεση είναι πολύ πιο πιθανό να συμβεί όταν η αντιγραφή του DNA και η κυτταρική διαίρεση βρίσκονται σε εξέλιξη. Πάραυτα, η συγκεκριμένη υπόθεση δεν έχει βάση αφού παρόμοιο ρυθμό κυτταρικής ανανέωσης και για μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων επιδεικνύει και το λεπτό έντερο με σημαντικά μικρότερα, όμως, ποσοστά ανάπτυξης καρκίνου.

Η ιστική ανανέωση, πάντως, αποτελεί σημαντική παράμετρο για την ανάπτυξη καρκίνου. Η διαδικασία ανώμαλου κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελεί μηχανισμό που συμβάλλει στην καρκινική ανάπτυξη καθώς ο αριθμός των προγονικών καρκινικών κυττάρων αυξάνεται κατά τη διάρκεια της καρκινογενετικής διαδικασίας (46).

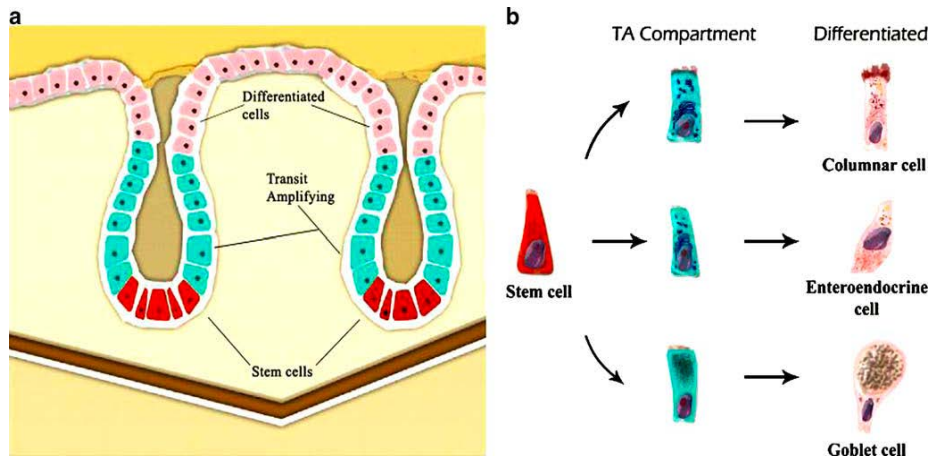
Τα προγονικά κύτταρα (SCs) είναι πολυδύναμα αδιαφοροποίητα κύτταρα τα οποία έχουν ως αποστολή τους τη διατήρηση της ιστικής ομοιόστασης αλλά και την επιδιόρθωση ενός ιστού μετά από βλάβη. Τα θυγατρικά τους κύτταρα είναι

περισσότερο διαφοροποιημένα και διαιρούνται με ταχύτερο ρυθμό. Στα βασικά χαρακτηριστικά τους περιλαμβάνονται η ικανότητα αυτοαναπαραγωγής, η ευπλαστικότητα, η δυνατότητα διαφοροποίησης προς ποικίλες κυτταρικές σειρές και η αναπαραγωγή των ιστών. Ο τρόπος διαίρεσής τους έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς καθορίζει τον τύπο των θυγατρικών κυττάρων και τον αριθμό των μελλοντικών κυτταρικών πληθυσμών. Η διαίρεση των προγονικών κυττάρων γίνεται είτε συμμετρικά ή ασύμμετρα. Η συμμετρική διαίρεση δίδει γένεση είτε σε δύο προγονικά κύτταρα ή σε δύο διαφοροποιημένα κύτταρα. Στην ασύμμετρη διαίρεση, παρατηρείται παραγωγή ενός πανομοιότυπου προγονικού κυττάρου κι ενός διαφοροποιημένου θυγατρικού (εικόνα 10) (43).



Εικόνα 10. Τύποι διαίρεσης των προγονικών κυττάρων. S: stem cell (προγονικό κύτταρο) P: progenitor cell (πρόδρομο ή διαφοροποιημένο κύτταρο) (Salama P, Platell C. Colorectal cancer stem cells. ANZ J Surg 2009q 79Q 697-702)

Στο παχύ έντερο τα προγονικά κύτταρα βρίσκονται στις βάσεις των κρυπτών και με την αργή ασύμμετρη διαίρεσή τους δίδουν γένεση σε δυο θυγατρικά κύτταρα, ένα πανομοιότυπο με το μητρικό (πολυδύναμο προγονικό) κι ένα περισσότερο διαφοροποιημένο κύτταρο. Το τελευταίο κατά τη μετανάστευσή του προς ανώτερες περιοχές των κρυπτών μέσω συνεχών διαιρέσεων και διαφοροποιήσεων δίδει γένεση στο διαφοροποιημένο εντερικό επιθηλιακό κύτταρο του εντερικού βλεννογόνου. Το παχύ έντερο έχει 3 ειδών διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα: τα απορροφητικά, τα βλεννοεκκριτικά και τα λιγότερο συχνά ευρισκόμενα εντεροενδοκρινικά κύτταρα (47).



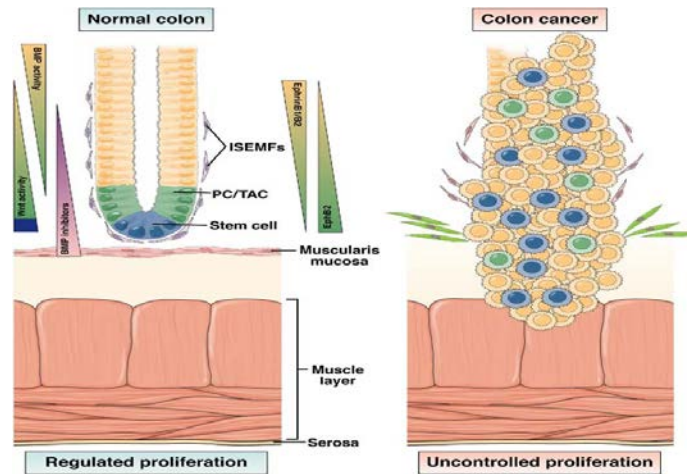
Εικόνα 11. Οργάνωση των εντερικών κρυπτών. α. Στην επιθηλιακή στιβάδα του φυσιολογικού εντερικού βλεννογόνου, τα προγονικά κύτταρα (κόκκινα) βρίσκονται στις βάσεις των κρυπτών. μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων, τα θυγατρικά κύτταρα που υφίστανται διαφοροποίηση, μεταναστεύουν προς την επιφάνεια, δίνοντας με τη σειρά τους γένεση σε ενδιάμεσα (πράσινα) και στα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα. β. Τύποι κυττάρων του εντερικού επιθηλίου. Τα προγονικά εντερικά κύτταρα δίδουν παράγον 3 τύπους επιθηλιακών κυττάρων: τα απορροφητικά κυλινδρικά κύτταρα, τα ορμονοπαραγωγά εντεροενδοκρινή κύτταρα και τα βλεννοπαραγωγά καλυκοειδή κύτταρα (Ricci-Vitiani L, Fabrizio E et al. Colon cancer stem cells. J Mol Med 2009; 87: 1097-1104)

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πλειονότητα των κυτταρικών διαιρέσεων λαμβάνει χώρα μόνο στις κατώτερες και μέσες περιοχές των κρυπτών και καθώς τα κύτταρα μετακινούνται προς ανώτερες περιοχές ο αριθμός αυτών που συνεχίζουν να διαιρούνται μειώνεται ενώ όταν φθάσουν στην ανώτερη μοίρα τα κύτταρα είναι πλήρως διαφοροποιημένα και παύουν να πολλαπλασιάζονται (εικόνα 11). Με βάση αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι αυτή η φυσιολογική αλληλουχία γεγονότων διαταράσσεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης καρκινικών βλαβών στο παχύ έντερο και με την αρωγή της μοριακής γενετικής έχει αποκτηθεί αρκετή γνώση σχετικά με τις γονιδιακές μεταβολές που οδηγούν σε διαταραχή των μηχανισμών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής διαίρεσης (13). Τα διαφοροποιημένα εντερικά κύτταρα έχουν βραχεία διάρκεια ζωής (ημέρες), ενώ τα φυσιολογικά προγονικά έχουν μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης άρα και περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μεταλλάξεις. Σύμφωνα με τη θεωρία εξέλιξης από αδένωμα σε καρκίνωμα, υπάρχει άθροιση μεταλλάξεων στο κύτταρο η οποία οδηγεί σε κακοήθη εξαλλαγή αυτού. Αυτές οι μεταλλάξεις συνοδεύονται από φαινοτυπικές μεταβολές στο βλεννογόνο. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα στοιχεία, τα προγονικά εντερικά κύτταρα παρουσιάζουν άθροιση μεταλλάξεων για μεγάλο χρονικό διάστημα προτού καταστούν εμφανείς οι φαινοτυπικές μεταβολές. Ιδιαίτερη σημασία φαίνεται ότι κατέχει και το μικροπεριβάλλον των προγονικών κυττάρων. Σε ιστούς με φυσιολογική λειτουργία τα κύτταρα δεν αυτοκαθορίζονται. Η δραστηριότητά τους καθορίζεται στενά από προσκείμενα κύτταρα, εξωκυττάριο υγρό και διαλυτούς παράγοντες που συνιστούν το μικροπεριβάλλον τους. Αν απομονωθούν από αυτό (πχ σε καλλιέργειες), χάνουν τη λειτουργία και τη διαφοροποίησή τους. Φαίνεται ότι το μικροπεριβάλλον ασκεί τη δράση του μέσω επιγενετικών μηχανισμών οι οποίοι αναστέλλουν είτε ευοδώνουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων χωρίς να μεταβάλλουν την αλληλουχία DNA (43).

Στο παχύ έντερο, οι δομές που αποτελούν το μικροπεριβάλλον σχηματίζονται από εντερικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (ISEMFs) που εντοπίζονται στη βάση των κρυπτών. Αυτοί οι μυοϊνοβλάστες ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται σε ανταπόκριση σε ποικίλους αυξητικούς παράγοντες όπως ορισμένοι που προέρχονται από τα αιμοπετάλια. Οι ISEMFs εμπλέκονται στην οργανογένεση, την προστασία από βλαπτικούς παράγοντες καθώς και την επιδιόρθωση μετά από εντερική βλάβη. Θεωρείται, επιπλέον, ότι κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο στην αυτοανανέωση και διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων εκκρίνοντας αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων, μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα-β και αυξητικό παράγοντα των κερατινοκυττάρων, των οποίων οι υποδοχείς βρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Εξωγενή αλλά και ενδογενή σήματα φαίνεται ότι ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον των προγονικών κυττάρων. Έτσι, πέραν των ISEMFs η οικογένεια υποδοχέων της τυροσινικής κινάσης ErbB συμμετέχει στη ρύθμιση του SC μικροπεριβάλλοντος. Η μετάδοση σήματος από την ErbB είναι απαραίτητη για την δημιουργία των επιμέρους κυτταρικών δομών και την οργάνωση της μετανάστευσης των επιθηλιακών κυττάρων κατά μήκος της κρύπτης. Επιπλέον, στη βάση των κρυπτών ανευρίσκονται Wnt πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα πυρηνικό πολλαπλασιασμό επαγόμενο από τη β-κατενίνη(β-catenin). Η β-κατενίνη διεγείρει την έκφραση ErbB υποδοχέων, που αλληλεπιδρούν με ErbB ligands σε υψηλότερα σημεία των κρυπτών προς επέκταση της περιοχής κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

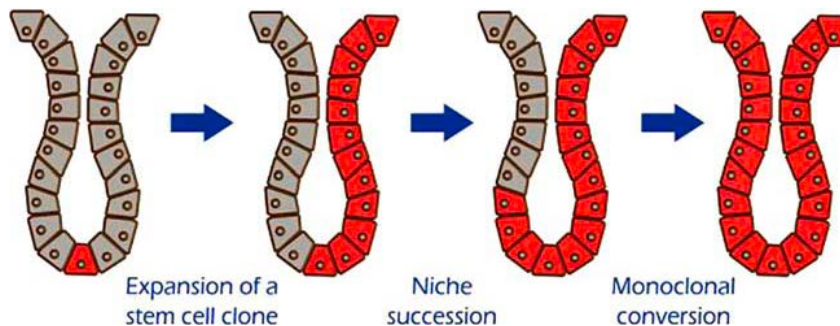
Πέραν του Wnt, κι άλλα μονοπάτια μετάδοσης σήματος έχουν αναγνωρισθεί ως ρυθμιστές – κλειδιά του μικροπεριβάλλοντος των προγονικών κυττάρων όπως αυτά που έχουν ως μεσολαβητή τη μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (BMP), τη Notch ή τη Sonic Hedgehog (Shh). Αυτός ο τύπος επιθηλιακής – μεσεγχυματικής μετάδοσης σήματος πιθανά οριοθετεί το μικροπεριβάλλον πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων από το διαφοροποιημένο επιθήλιο με περιορισμό των κυττάρων που εκφράζουν την Wnt στην βάση των κρυπτών. Διαφορετική έκφραση έχει αναφερθεί και για τα διάφορα συστατικά του BMP μονοπατιού κατά μήκος του άξονα της κρύπτης. Έτσι, στην κορυφή παρατηρείται υψηλή έκφραση των BMP1, BMP2, BMP5, BMP7, SMAD7 και υποδοχέα BMP τύπου 2 ενώ στη βάση της κρύπτης των 3 BMP ανταγωνιστών δηλ. της γκρεμλίνης 1(GREM1), της γκρεμλίνης 2(GREM2) και της ομοιάζουσας στη χορδίνη τύπου 1. Οι 3 τελευταίοι ανταγωνιστές προέρχονται πιθανόν από μυοϊνοβλάστες και λείες μυϊκές ίνες και συμβάλλουν στη δημιουργία του μικροπεριβάλλοντος των εντερικών προγονικών κυττάρων μέσω ρύθμισης της Wnt δραστηριότητας. Ο αποσυντονισμός όλων των προαναφερόμενων μονοπατιών μετάδοσης σήματος σχετικά με τα προγονικά κύτταρα οδηγεί στην ανάπτυξη κακοήθειας εντός του εντερικού αυλού (εικόνα 12) (48).

Σύμφωνα με την υπόθεση ανάπτυξης νεοπλασίας από προγονικά κύτταρα, το πρώτο επεισόδιο μετάλλαξης συμβαίνει σε ένα προγονικό κύτταρο στην εντερική κρύπτη, το οποίο λόγω της μακράς διάρκειας ζωής του αθροίζει ογκογενετικές μεταλλάξεις σε βάθος χρόνων ή δεκαετιών.



Εικόνα 12. Μοντέλο της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάδοσης του σήματος που καθορίζει το μικροπεριβάλλον SC σε φυσιολογικό έντερο ή σε έντερο με καρκίνο (Todaro M, Francipane MG et al. Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy. Gastroenterology 2010; 138: 2151-62)

Όταν εξαλλαχθούν, τα μεταλλαγμένα προγονικά κύτταρα μπορούν να διαιρεθούν συμμετρικά ή ασύμμετρα με αποτέλεσμα την παραγωγή άλλων προγονικών καρκινικών ή θυγατρικών κυττάρων, τα οποία εν συνεχεία δίδουν γένεση σε άλλα καρκινικά κύτταρα χωρίς ικανότητα αυτοαναπαραγωγής. Εν τέλει, το μικροπεριβάλλον αποικίζεται από μεταλλαγμένα κύτταρα, και η κρύπτη καταλαμβάνεται από θυγατρικά κύτταρα, γεγονός που περιγράφεται ως μονοκλωνική εκτροπή (εικόνα 13). Τα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα θα υποστούν στη συνέχεια κι άλλες μεταβολές που θα οδηγήσουν στην πρόοδο της νόσου.



Εικόνα 13. Μονοκλωνική εκτροπή της κρύπτης (Ricci-Vitiani L, Fabrizio E et al. Colon cancer stem cells. J Mol Med 2009; 87: 1097-1104)

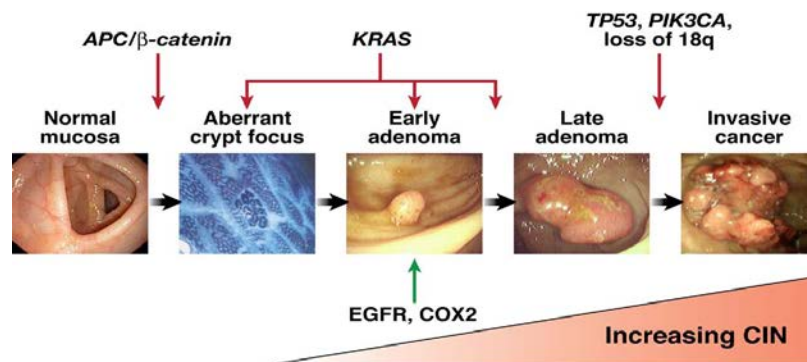
Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει τελεστεί τα τελευταία χρόνια στη βιολογία των προγονικών κυττάρων, η αναγνώριση, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός αυτών στις εντερικές κρύπτες παραμένει προβληματικός (47). Το ίδιο ισχύει και για τα καρκινικά προγονικά κύτταρα. Μέχρι σήμερα, η πλέον σημαντική μέθοδος που χρησιμοποιείται για αυτό το σκοπό είναι η αναγνώριση δεικτών επιφανείας μέσω ανοσοϊστοχημείας. Η

παρουσία αυτών των δεικτών διευκολύνει τη συγκέντρωση των νεοπλασματικών κυττάρων σε υποομάδες με ογκογενετικές ιδιότητες. Άλλες μέθοδοι είναι η ανεύρεση κάποιων μορφολογικών χαρακτηριστικών όπως οι <<δίκην καμπάνας>> πυρήνες και η θέση τους στη βάση των κρυπτών, τα μοντέλα μεθυλίωσης του DNA και οι πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA (43).

5B) Μοριακή γενετική

Σύμφωνα με τα υφιστάμενα επιστημονικά δεδομένα, ποσοτικές ή ποιοτικές μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση ευθύνονται για την ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου. Σε γενικές γραμμές, οι γενετικές διαταραχές που μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο στο παχύ έντερο μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες: μεταβολές σε ογκογονίδια, απώλεια της λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ανωμαλίες σε γονίδια υπεύθυνα για την επιδιόρθωση βλαβών του DNA (13).

Η παρατήρηση ότι, η άθροιση μεταλλάξεων που αφορούν ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια ακολουθεί την εξέλιξη της νόσου σε συνδυασμό με την εξέλιξη από αδένωμα σε καρκίνωμα οδήγησε τους Fearon και Vogelstein, το 1990, στην ανάπτυξη του <<πολυσταδιακού γενετικού μοντέλου από αδένωμα σε καρκίνωμα>> το οποίο αποτέλεσε παράδειγμα για τη διαδικασία εξέλιξης ενός συμπαγούς όγκου. Με βάση αυτό το μοντέλο, η νεοπλασματική διαδικασία άρχεται με APC (adenomatous polyposis coli) και β-catenin μεταλλάξεις και εξελίσσεται μέσω διαδοχικών μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια, όπως τα K-Ras και p53, στα πλαίσια μιας εξελισσόμενης γονιδιακής αστάθειας (εικόνα 14) (47).



Εικόνα 14. Γενετικό μοντέλο καρκινογένεσης παχέος εντέρου πολλαπλών σταδίων (Pino M, Chung D. The Chromosomal instability Pathway in Colon Cancer. Gastroenterology 2010; 138: 2059-72)

Σε πρόσφατες γονιδιακές μελέτες μετρήθηκαν περί τα 80 μεταλλαγμένα γονίδια ανά ορθοκολικό καρκίνο, αν και μια μικρότερη ομάδα μεταλλάξεων (< 15) θεωρούνται ότι αποτελούν τους πραγματικούς <<οδηγούς>> της καρκινογενετικής διαδικασίας (49). Η αποσταθεροποίηση του γενετικού υλικού αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό όγκων και κατά κύριο λόγο περιλαμβάνει χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) με επακόλουθη απώλεια αλληλίων, χρωμοσωμικές ενισχύσεις και μεταθέσεις ή αυξημένο ρυθμό ενδογονιδιακών μεταλλάξεων σε διπλά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA γνωστές και ως μικροδορυφόρους (μικροδορυφορική αστάθεια) (13).

Ο βασικός ρυθμός μεταλλάξεων των κυττάρων είναι ανεπαρκής για τις πολλαπλές μεταλλάξεις που απαιτούνται για την ανάπτυξη καρκίνου. Ο ρυθμός μεταλλάξεων ανά ζεύγος νουκλεοτιδικών βάσεων υπολογίζεται ότι είναι 10^{-9} ανά κυτταρική γενεά. Όπως αναφέρουν οι Loeb et al. (2003), τα καρκινικά κύτταρα θα πρέπει να αποκτήσουν κάποια μορφή ενδογενούς γονιδιακής αστάθειας, <<ένα μεταλλαξιγόνο φαινότυπο>>, που να αυξάνει το ρυθμό εμφάνισης νέων μεταλλάξεων. Η χρωμοσωμική αστάθεια, που αφορά το 65% - 70% των σποραδικών ΚΠΕ, περιλαμβάνει έναν επιταχυνόμενο ρυθμό απόκτησης ή απώλειας ολόκληρων ή μεγάλων τμημάτων χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα καρυοτυπική μεταβλητότητα από κύτταρο σε κύτταρο. Παρεπόμενο της χρωμοσωμικής αστάθειας είναι η διαταραχή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία), οι γονιδιακές ενισχύσεις, καθώς και η αυξημένη συχνότητα απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH). Μεθοδολογικά, οι κυριότερες προσπάθειες εκτίμησης της χρωμοσωμικής αστάθειας περιλαμβάνουν την κυτταρομετρία, τη δημιουργία καρυότυπου, την ανάλυση απώλειας της ετεροζυγωτίας, τον *in situ* φθορίζοντα υβριδισμό και πιο πρόσφατα τη συγκριτική γονιδιακή υβριδοποίηση. Κάποιο ελάττωμα στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA οδηγεί σε μία δεύτερη οδό γονιδιακής αστάθειας, η οποία χαρακτηρίζεται από αστάθεια στους μικροδορυφόρους DNA ενώ μία τρίτη οδός είναι αυτή που περιλαμβάνει τη δημιουργία σιωπηρών γονιδίων λόγω υπερμεθυλίωσης των CpG νησιδίων (CIMP). Η ύπαρξη, πάντως, σε έναν όγκο μιας οδού χρωμοσωμικής αστάθειας δεν αποκλείει τη συνύπαρξη και άλλης/ων.

APC/β-catenin. Το πλέον πρώιμο γενετικό συμβάν στη διαδικασία καρκινογένεσης στο παχύ έντερο είναι η ενεργοποίηση της Wnt οδού μετάδοσης σήματος μέσω γενετικού διαμελισμού του APC ογκοκατασταλτικού γονιδίου στη θέση 5q21. Κληρονομικές μεταλλάξεις του APC είναι υπεύθυνες για την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση. Σωματικές μεταλλάξεις του APC παρατηρούνται στο 5% των δυσπλαστικών εντερικών κρυπτών, στο 30% - 70% των σποραδικών αδενωμάτων και στο 72% περίπου των σποραδικών καρκινωμάτων, στοιχεία που δείχνουν ότι η απώλεια της λειτουργικότητας του APC γονιδίου αποτελεί γεγονός που εμφανίζεται αρκετά νωρίς στη φάση έναρξης της καρκινογένεσης.

Το προϊόν του APC γονιδίου είναι μια ευμεγέθης πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει τη διαφοροποίηση, την προσκόλληση, την πολικότητα, τη μετανάστευση, την ανάπτυξη, την απόπτωση και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Βασική λειτουργία της αποτελεί η αλληλεπίδρασή της με τη συνθετική κινάση-3β του γλυκογόνου και τη β-κατενίνη, εκ των οποίων καθεμιά αποτελεί θεμελιώδες συστατικό της Wntless/Wnt οδού μετάδοσης σήματος. Η APC πρωτεΐνη προσδένεται στη β-κατενίνη, στη συνθετική κινάση-3β του γλυκογόνου και στην καζεϊνική κινάση 1α/ε με επακόλουθο τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης από τη γλυκογονική συνθετική κινάση η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε – εξαρτώμενη από το πρωτεάσωμα – αποδόμηση και καταστολή της Wnt μετάδοσης σήματος. Η παρουσία μεταλλαγμένης APC πρωτεΐνης διακόπτει τη δημιουργία του συμπλέγματος με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα η οποία μπορεί να μεταφερθεί στον πυρήνα όπου διεγείρει τη μεταγραφή πολλαπλών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου και τη διεϊσδυση αυτού μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον παράγοντα των T – λεμφοκυττάρων (49).

K-RAS. Τα πρωτοογκογονίδια αποτελούν εξελικτικά συντηρηθέντα ανθρώπινα γονίδια που περιέχουν αλληλουχίες DNA ομόλογες με εκείνες των οξέως μεταβληθέντων ρετροϊών. Πολλά εξ αυτών παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης. Η αδόκιμη ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων οδηγεί σε ανώμαλη μετάδοση ρυθμιστικών σημάτων - μηνυμάτων από την επιφάνεια στον πυρήνα του κυττάρου, με αποτέλεσμα ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επακόλουθη ανάπτυξη όγκου. Στον άνθρωπο, τα *ras* γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο στις ενδοκυττάριας οδούς μετάδοσης σήματος είναι τρία: τα *K-ras*, τα *N-ras* και τα *H-ras* γονίδια. Κατά προσέγγιση, το 65% των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου έχουν σημειακές μεταλλάξεις σε *ras* γονίδια, με το 30 – 50% να εμπεριέχει *K-ras* μεταλλάξεις (13,49).

Οι μεταλλάξεις των *ras* πρωτεϊνών προκαλούν συνήθως ενεργοποίηση της *ras* GTPάσης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε υπερενεργοποίηση των οδών μετάδοσης σήματος με κατάληξη τον μετασχηματισμό του κυττάρου και την ογκογένεση(50).

Πλείστες *ras* μεταλλάξεις φαίνεται ότι λαμβάνουν χώρα στα ενδιάμεσα στάδια ανάπτυξης αδενωμάτων – σύμφωνα με την υπόθεση των Fearon και Vogelstein. Έτσι, *ras* μεταλλάξεις έχουν ανευρεθεί στο 47% των καρκινωμάτων, στο 58% των αδενωμάτων μεγέθους μεγαλύτερου του 1cm, και μόνο στο 10% των αδενωμάτων με μέγεθος μικρότερο του 1cm, στοιχεία που δείχνουν προφανώς ότι υπάρχουν πρωιμότερα γεγονότα τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία νεοπλασμάτων (13).

Μεταλλάξεις σε *K-ras* γονίδια έχουν εντοπιστεί σε ποικίλους καρκίνους στον άνθρωπο, όπως στον καρκίνο του πνεύμονα, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου.

Η παρουσία ενός μεταλλαγμένου *K-ras* γονιδίου έχει συνέπειες σε διάφορες παραμέτρους που αφορούν τον ΚΠΕ : προαγωγή της εμφάνισης όσο και της ανάπτυξης του όγκου, της επιβίωσης αυτού, της προόδου του, της τοπικής διήθησης, της δημιουργίας μεταστάσεων, της αγγειογένεσης και της ανοσολογικής απόκρισης. Ο ρόλος της *K-ras* μετάλλαξης στον επιθηλιακό κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι καλά τεκμηριωμένος και ενισχύεται από την παρουσία τοιούτων σε πρώιμες καρκινικές βλάβες από κλινικά δείγματα. Πάραυτα, δεν είναι διόλου σαφές εάν μια τέτοιου τύπου μετάλλαξη είναι απολύτως απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των εντερικών καρκινικών κυττάρων σε απώτερο στάδιο ή σε μεταστατικές εστίες. Η μεταλλαγμένη *K-ras* πρωτεΐνη προάγει, επίσης, την αγγειογένεση και τοιουτοτρόπως υποβοηθείται η εξέλιξη της νεοπλασίας. Πέραν της αγγειογένεσης και της νεοπλασματικής ανάπτυξης, η παρουσία της *K-ras* μετάλλαξης είναι σημαντική για την προαγωγή της μετάστασης του όγκου. Τόσο για την τοπική διήθηση όσο και για τη διασπορά του πρωτοπαθούς όγκου, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να διαπεράσουν τη βασική μεμβράνη του επιθηλίου. Τα κύτταρα σε αυτή την περίπτωση παράγουν μεσοκυττάριας μεταλλοπρωτεάσες (MMPs), πρωτεάσες κυστεΐνης, πρωτεάσες σερίνης, και ενεργοποιητή της ουροκινάσης του πλασμινογόνου (uPA) που διασπούν τη βασική μεμβράνη και διευκολύνουν με αυτό τον τρόπο τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων.

Η επίδραση του status μετάλλαξης του *K-ras* γονιδίου στην κλινική έκβαση των ασθενών με ΚΠΕ δεν είναι επαρκώς τεκμηριωμένη και καθορισμένη. Υπάρχουν,

βεβαίως, ορισμένα στοιχεία που δείχνουν ότι οι όγκοι με K- ras μετάλλαξη έχουν επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά (50).

TP53(p53). Το γονίδιο TP53 εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17. Κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός παράγοντα καταστολής των όγκων και κεντρικού συντονισμού των κυτταρικών αποκρίσεων στο στρες, συμπεριλαμβανομένων των βλαβών του DNA, του οξειδωτικού στρες και των σημάτων ανώμαλου πολλαπλασιασμού. Το TP53 επάγεται από διάφορες ογκογόνες πρωτεΐνες, όπως η c-Myc, η RAS και ο αδενοϊός E1A. Θεωρείται <<φρουρός του γενετικού υλικού>>, αφού αντιπροσωπεύει τον κύριο ρυθμιστή που ελέγχει τη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του DNA, την απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη γήρανση, την αγγειογένεση, την ανοσολογική απόκριση, την κυτταρική διαφοροποίηση, την κινητικότητα και τη μετανάστευση (49). Η απώλεια της λειτουργικότητας του p53 γονιδίου συνδέεται με ελαττωμένη απόπτωση βλαμμένων κυττάρων και αποτελεί σημαντικό και όψιμο γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης (13). Η διαταραχή της λειτουργίας του αποτελεί χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των νεοπλασιών στον άνθρωπο και αναφέρεται στο 4% - 26% των αδενωμάτων, στο 50% των αδενωμάτων με διηθητικές εστίες και στο 50% - 75% των ΚΠΕ, δείχνοντας ξεκάθαρα το ρόλο που έχει η αδρανοποίησή του για τη μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα. Οι περισσότερες (~ 80%) των μεταλλάξεων του p53 είναι μεταλλάξεις αλλαγής κωδικονίου που αντιστοιχεί σε διαφορετικό αμινοξύ (missense): οι αλλαγές βάσεων από GC σε AT που συμβαίνουν κυρίως σε 5 μείζονος σημασίας κωδικόνια {175, 245, 248, 273 και 282}. Αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν στη σύνθεση μιας ανενεργού πρωτεΐνης με ανώμαλα επιμηκυμένη διάρκεια ζωής η οποία ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους.

Τα γονίδια p63 και p73 έχουν δομική και λειτουργική συνάφεια με το p53, και πιθανόν διαδραματίζουν επίσης κάποιο ρόλο στην καταστολή των όγκων. Παρότι έχει βρεθεί πρόσφατα η απώλειά τους σε πολλούς τύπους καρκίνου, η εμπλοκή τους στη διαδικασία καρκινογένεσης δεν έχει καθορισθεί ακόμη.

Απώλεια του 18q. Η απώλεια αλληλίων στο χρωμόσωμα 18q έχει αναγνωρισθεί περίπου στο 70% των πρωτοπαθών ΚΠΕ, κυρίως σε αυτούς που βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια. Το γονίδιο *διαγραφής σε ΚΠΕ* (deleted in colorectal carcinoma, DCC) είχε προταθεί αρχικά ότι κωδικοποιεί έναν καταστολέα ΚΠΕ, όμως το προϊόν του είναι ένας επιφανειακός υποδοχέας για την πρωτεΐνη netrin-1 των νευρώνων και DCC μεταλλάξεις έχουν ανιχνευθεί σπάνια σε ΚΠΕ. Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια στο χρωμόσωμα 18q είναι τα SMAD2 και SMAD4 που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης, μεταλλάξεις όμως αυτών των δύο γονιδίων έχουν ανευρεθεί μόνο σε <20% και < 10% των ΚΠΕ, αντίστοιχα για το καθένα. Τα cables, τα οποία πρόσφατα χαρτογραφήθηκαν στο χρωμόσωμα 18q11.2-12.1, αποτελούν έναν ακόμη υποψήφιο. Απώλεια της έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων παρατηρείται στο 60% - 70% των σποραδικών ΚΠΕ (49).

Οι μεταλλάξεις του 18q όπως και του 17p γονιδίου – απώλειες αλληλίων και διαγραφές - σχετίζονται με την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων των ΚΠΕ (13).

Κυκλοξυγενάση – 2. Η διαταραγμένη υπερέκφραση της κυκλοξυγενάσης-2 (COX-2) θεωρείται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ΚΠΕ. Η COX-2, ένα γονίδιο

πρώιμης ανταπόκρισης που επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, από κυτταροκίνες, από μεσολαβητές φλεγμονής και από παράγοντες ενισχυτικούς για την ογκογένεση, υπερεκφράζεται στο 43% των αδενωμάτων και στο 86% των καρκινωμάτων. Οι ογκογενετικές ιδιότητες της COX-2 μπορούν να αποδοθούν στην παραγωγή της προσταγλανδίνης E2. Αυξημένα επίπεδα προσταγλανδίνης E2 αναφέρονται τόσο σε αδενώματα όσο και σε καρκινώματα του παχέος εντέρου. Η COX-2 και η προσταγλανδίνη E2 ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετανάστευση και τη διηθητική ικανότητα των ΚΠΕ. Η υπερέκφραση της COX-2 επάγει την παραγωγή προαγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων και ο αυξητικός παράγων των ινοβλαστών της βασικής μεμβράνης (49). Στα ανωτέρω δεδομένα στηρίζεται και η χορήγηση των COX-2 αναστολέων ως χημειοπροφύλαξη για τον ΚΠΕ. Με βάση τις υπάρχουσες μελέτες, οι COX-2 αναστολείς προλαμβάνουν με επιτυχία την υποτροπή εμφάνισης πολυπόδων, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη δημιουργία αδενωμάτων, αν και η ευρεία χρήση τους περιορίζεται από τον αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων (13,49). Η βελτιωμένη γνώση της γενετικής βάσης του ΚΠΕ έχει επιτρέψει την αναγνώριση νέων προγνωστικών μοριακών δεικτών και θεραπειών για τον ΚΠΕ. Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει για να διευκρινισθεί εάν οι KRAS, TP53 και 18q μεταλλάξεις θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες πρόγνωσης. Έτσι, κάποια στοιχεία έχουν δείξει αυξημένο κίνδυνο καρκινικής υποτροπής και θανάτου σε ασθενείς με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του KRAS γονιδίου, ενώ κάποιες άλλες έχουν αποτύχει στην επιβεβαίωση μιας τέτοιας συσχέτισης. Παράλληλα, υπάρχουν ισχυρισμοί ότι η TP53 μετάλλαξη σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου, αυτό όμως φαίνεται να περιορίζεται μόνο στους ασθενείς που είχαν ήδη τη χειρότερη πρόγνωση (στάδιο D κατά Duke's). Ακόμη, ένας αριθμός μελετών έχει συσχετίσει τη διαγραφή αλληλίων του χρωμοσώματος 18q με πτωχότερη πρόγνωση ενόσω δύο πρόσφατες μελέτες απέτυχαν στην επικύρωση αυτών των πρώιμων παρατηρήσεων. Ως εκ τούτου, κανένας ιδιαίτερος δείκτης δεν χρησιμεύει σαν μοριακός προγνωστικός παράγων. Εντούτοις, με βάση υφιστάμενα στοιχεία, ο συνολικός φαινότυπος χρωμοσωμικής αστάθειας συνδέεται με λιγότερο ευνοϊκή έκβαση στους ασθενείς σε σύγκριση με εκείνους που έχουν όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια. Οι ασθενείς με χρωμοσωμική αστάθεια επιδεικνύουν σταθερά χαμηλά ποσοστά συνολικής και ελεύθερης νόσου επιβίωσης, ανεξαρτήτως εθνικότητας, ανατομικής εντόπισης του όγκου ή θεραπείας με φθοριοουρακίλη συγκρινόμενοι με εκείνους που έχουν καρκίνους με μικροδορυφορική αστάθεια. Η θεραπευτική προσέγγιση των οδών εκείνων που εκκινούν και συντηρούν τη χρωμοσωμική αστάθεια έρχεται συνεχώς όλο και περισσότερο στο προσκήνιο. Μικρομοριακοί αναστολείς των Aurora κινασών, οι Plks, η spindle motor πρωτεΐνη Eg5 και το CENP-E έχουν επιδείξει αντικαρκινική δράση σε προκλινικά μοντέλα και βρίσκονται ήδη σε φάση μελέτης I και II για τη θεραπεία συμπαγών όγκων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση από τους Swanton και συν. ότι οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια είναι ανθεκτικοί στη θεραπεία με ταξάνες λόγω της ομοιότητας των οδών που ρυθμίζουν το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση και εκείνων που εμπλέκονται στην ανταπόκριση στις ταξάνες (49).

Μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) - MMR γονίδια. Η μικροδορυφορική αστάθεια είναι μια υπερμεταλλαξιγόνοσ κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μεταβολές στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MMR), οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε αδυναμία επιδιόρθωσης λαθών κατά τη σύζευξη των ζευγών των βάσεων με αποτέλεσμα σφάλματα αντιγραφής του DNA ή MSI (13,51).

Τα MMR γονίδια είναι τα: hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH2, hMSH3 και hMSH6. Η απενεργοποίηση του συστήματος MMR προκαλεί γονιδιακή αστάθεια αυξάνοντας το ρυθμό των σφαλμάτων αντιγραφής από την πολυμεράση και υποβιβάζοντας την πιστότητα αντιγραφής του DNA, ιδιαίτερος όσον αφορά τις επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Η MSI αφορά μεταλλάξεις ή αστάθεια σε βραχείες, διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA όπως (A)_n, (CA)_n και (GATA)_n. Τέτοιες αλληλουχίες DNA βρίσκονται σε διάφορα γονίδια-κλειδιά, σημαντικά για τη διατήρηση της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας. Ο υποδοχέας του TGF-βRII (transforming growth factor-β) υφίσταται συχνά μετάλλαξη ως αποτέλεσμα MSI. Φαίνεται ότι η TGF-βRII οδός αποτελεί ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό μονοπάτι στο παχύ έντερο, και οι μεταβολές αυτού οδηγούν στην ανάπτυξη καρκίνου. Άλλα, λιγότερο συχνά γονίδια – στόχοι είναι τα: IGF1R (insulin growth factor 2 receptor), Bax και caspase 5 που αποτελούν πρωτεΐνες ρυθμιστικές της απόπτωσης, ο παράγων μεταγραφής E2F4, και οι MSH3 και MSH6 πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA. Μεταλλάξεις στη β-catenin παρατηρούνται στο 25% των ΚΠΕ με MSI. Η MSI, λοιπόν, οδηγεί σε άθροιση μεταλλάξεων σε ευπαθή γονίδια με κατάληξη την υιοθέτηση ενός κακοήθους γονότυπου. Παρότι η MSI χαρακτηρίζει κυρίως τον κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου (HNPCC), ανάλογες μεταλλάξεις ανευρίσκονται και στο 10% -15% των σποραδικών ΚΠΕ αλλά και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις. Οι ασθενείς με ΚΠΕ με MSI έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση από εκείνους των οποίων οι όγκοι χαρακτηρίζονται από χρωμοσωμική αστάθεια και διαφορετική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (13).

Υπάρχουν δύο μοριακά μονοπάτια για ανάπτυξη ΚΠΕ με MSI.

Το 20% - 25% των ΚΠΕ με MSI εμφανίζονται σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch. Αυτοί οι όγκοι περιέχουν germline μετάλλαξη σε ένα MMR γονίδιο, που ακολουθείται από μία δεύτερη στο wild-type αντίγραφο (το κληρονομούμενο από τον φυσιολογικό γονέα)· κάτι τέτοιο θα μπορούσε να συμβεί μέσω απώλειας ετεροζυγωτίας, μεθυλίωσης ή σημειακής μετάλλαξης. Οι διαταραχές των MMR γονιδίων καταλήγουν σε μικροδορυφορική αστάθεια και σε ταχεία συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων. Πιθανολογείται ότι οι καρκίνοι άρχονται μέσω μεταλλάξεων σε ολίγα καίρια γονίδια, αλλά συμβαίνουν επίσης πολλές μικροδορυφορικές μεταλλάξεις, οι περισσότερες εκ των οποίων είναι <<απλοί περαστικοί>> που απλώς δίνουν την μεταλλαξιγόνο υπογραφή τους προς αναγνώριση των όγκων με MSI. Σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch οι καρκίνοι που αναπτύσσονται στο έντερο έχουν συχνά KRAS μεταλλάξεις. Οι περισσότερες, πάντως, περιπτώσεις ΚΠΕ με MSI δεν κληρονομούνται αλλά προκύπτουν μέσω σποραδικής, μετά μεθυλίωση, δημιουργίας σιωπηρού MLH1 γονιδίου.

Ο κίνδυνος ΚΠΕ είναι αυξημένος στους ασθενείς με ιδιοπαθή εντερικά νοσήματα, παρότι δεν είναι πλήρως διευκρινισμένο το πώς η χρόνια φλεγμονή μεσολαβεί στην

ανάπτυξη καρκίνου. Η φλεγμονή δυναμικά αυξάνει τη μεταλλαξιγένεση μέσω πρόκλησης οξειδωτικού στρες και σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Η αναγέννηση του βλεννογόνου γίνεται με διέγερση του πολλαπλασιασμού, η οποία θα μπορούσε να δημιουργήσει μεγαλύτερους πληθυσμούς μεταλλαγμένων κυττάρων στο έντερο με πλεονεκτήματα όσον αφορά την επιβίωση ή τον πολλαπλασιασμό. Μελέτες, βέβαια, σε δυο in vitro μοντέλα έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να <<χαλαρώνει>> την δραστηριότητα MMR στο DNA και άλλη μία μελέτη αναφέρει αύξηση του ρυθμού μεταλλάξεων σε κύτταρα που υποβάλλονται σε οξειδωτικό στρες. Υπάρχουν, επίσης, στοιχεία που δείχνουν την ύπαρξη MSI σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (51).

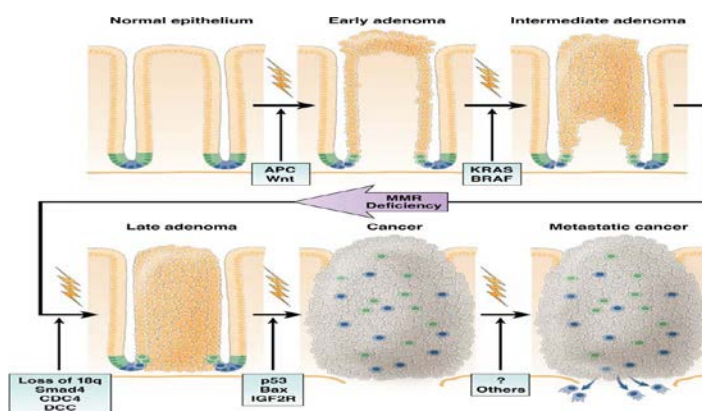
Γενετικό μοντέλο πολλαπλών βημάτων για την ανάπτυξη ΚΠΕ

Το μοντέλο αυτό προτάθηκε από τον Vogelstein et al. (1988), και η βασική αρχή από την οποία διέπεται είναι η διαδοχική φύση των μοριακών γενετικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα (εικόνα 15).

Το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη ενός αδενώματος είναι οι μεταβολές στο APC γονίδιο το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q21-22. Οι μεταλλάξεις του APC γονιδίου ομού μετά της απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) του χρωμοσώματος 5 αποτελούν τα πρωιμότερα γεγονότα κατά τη δημιουργία ενός αδενώματος (αδένωμα τάξης I). Η απώλεια ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 5 συμβαίνει σε ένα κύτταρο ενός όγκου στο οποίο υφίσταται ήδη μια εντοπισμένη μετάλλαξη του APC γονιδίου και μπορεί να αδρανοποιήσει το εναπομείναν φυσιολογικό αντίγραφο του APC γονιδίου. Εντούτοις, σε ορισμένες περιπτώσεις, η LOH του χρωμοσώματος 5 μπορεί να αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός σε κύτταρα χωρίς προηγηθείσα APC μετάλλαξη.

Το δεύτερο βήμα γίνεται στο ras γονίδιο και διευκολύνει την πρόοδο από ένα μικρό αδένωμα χαμηλής κακοήθειας σε ένα μεγαλύτερο, περισσότερο δυσπλαστικό (αδένωμα τάξης II). Έτσι, παρότι οι ras μεταλλάξεις θεωρείται ότι πραγματοποιούνται κατά την πρώιμη φάση της καρκινογένεσης, φαίνεται ότι λαμβάνουν χώρα μετά τις APC μεταλλάξεις. Μεταλλάξεις σε ένα ras γονίδιο (H-ras, K- ras, N- ras) αναγνωρίζονται περίπου στο 50% των ΚΠΕ, στο 50% των αδενωμάτων με διάμετρο > 1cm και μόνο στο 10% αυτών με d < 1cm. Αν και οι ras μεταλλάξεις δεν αντιπροσωπεύουν αρχικά γεγονότα στη δημιουργία αδενωμάτων, τα αδενώματα με ras μετάλλαξη πιθανόν να αναπτύσσονται και να εμφανίζουν δυσπλασία με ταχύτερο ρυθμό σε σύγκριση με εκείνα χωρίς τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Οι περισσότερες ras μεταλλάξεις στον ΚΠΕ είναι K- ras και μπορεί να συμβούν σε ένα κύτταρο ενός προϋπάρχοντος αδενώματος συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξή του σε ένα μεγαλύτερο και πλέον δυσπλαστικό αδένωμα.

Σε ένα τρίτο βήμα παρατηρούνται μεταλλάξεις στα γονίδια 18q (LOH, DCC, CDC4,) ή στα MMR που οδηγούν στη δημιουργία ενός αδενώματος τάξης III ενώ το επόμενο βήμα περιλαμβάνει μεταβολές στο p53 γονίδιο, που συμβάλλουν στην κακοήθη μετατροπή ενός αδενώματος. Μεταλλάξεις του p53 γονιδίου παρατηρούνται στο 75% - 85% των ΚΠΕ και σπάνια σε αδενώματα. Μελέτες έχουν δείξει ότι, σε όγκους που περιέχουν περιοχές αδενωμάτων και καρκινωμάτων ταυτόχρονα, η μετάλλαξη και LOH του p53 μπορεί να συνδέονται άμεσα με την εξέλιξη από αδένωμα σε καρκίνο. Στην πραγματικότητα, η αδρανοποίηση του p53 γονιδίου από μετάλλαξη ή απώλεια ετεροζυγωτίας παρατηρείται συχνά μόνο σε ΚΠΕ (48,52).



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου με βάση το μοντέλο των Vogelstein και Fearon (Todaro M, Francipane MG et al. Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy Gastroenterology 2010; 138: 2151-62)

Μη πολυποειδείς καρκινικές βλάβες

Οι μη πολυποειδείς πρώιμοι ΚΠΕ φαίνεται ότι έχουν διαφορετικά γενετικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά από τους πολυποειδείς και η ανάπτυξή τους φαίνεται ότι αποτελεί πιθανόν μια de novo διαδικασία καρκινογένεσης. Γενετικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι οι όγκοι αυτοί επιδεικνύουν ένα μοντέλο γενετικών μεταβολών διαφορετικό. Η μετάλλαξη του p53 δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές αλλά ο ρυθμός της K-ras μετάλλαξης είναι σαφώς χαμηλότερος στις μη πολυποειδείς βλάβες. Αυτό δείχνει ότι τα γενετικά μονοπάτια ανάπτυξης καρκίνου είναι διαφορετικά σε αυτούς τους δυο τύπους ΚΠΕ (52).

Φλεγμονή και ΚΠΕ

Οι περισσότερες περιπτώσεις ΚΠΕ σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με περιβαλλοντικούς παράγοντες παρά με κληρονομικές γενετικές αλλοιώσεις. Ως σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου θεωρούνται τροφικά ή περιβαλλοντικά μεταλλαξιογόνα, συγκεκριμένα εντερικά παθογόνα και συμβιωτικά καθώς και η χρονίζουσα εντερική φλεγμονή, που ευνοεί την ανάπτυξη καρκίνου.

Περισσότερο από το 20% των ασθενών με ΙΦΝΕ εμφανίζουν καρκίνο μέσα σε 30 χρόνια από την έναρξη της νόσου ενώ > 50% αυτών θα καταλήξουν από ΚΠΕ.

Βασικά στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας στο παχύ έντερο, όπως η δημιουργία ανώμαλων εστιών στις κρύπτες, πολυπόδων, αδενωμάτων και καρκινωμάτων, είναι παρόμοια για φλεγμονώδεις ή μη φλεγμονώδεις ΚΠΕ. Στην περίπτωση, όμως, του μη φλεγμονώδους ΚΠΕ μπορεί να υπάρχουν διαφορές στην εξέλιξη της παθογενετικής διαδικασίας με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκινώματος χωρίς τον ενδιάμεσο σχηματισμό ενός σαφώς καθορισμένου αδενώματος (53).

6. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο ΚΠΕ είναι μία από τις πλέον κοινές κακοήθειες με ένα από τα μεγαλύτερα ποσοστά οικογενών περιπτώσεων (54). Αν και θα ήταν πιθανόν βολική μια κατηγοριοποίηση

των ΚΠΕ σε κληρονομικούς (ή οικογενείς) και μη κληρονομικούς (ή σποραδικούς), γεγονός είναι ότι όλοι οι καρκίνοι έχουν, σε ποικίλο βαθμό, γενετικό υπόστρωμα – κληρονομούμενο ή επίκτητο. Συνεπώς, ασθενείς με οικογενή ΚΠΕ, γεννιούνται με ένα μεταλλαγμένο γονιδίωμα, ενώ το περιβάλλον συνεισφέρει επιπρόσθετα γενοτοξικά γεγονότα, που οδηγούν στη δημιουργία ενός κακοήθους φαινότυπου. Στην περίπτωση των σποραδικών καρκίνων, το περιβάλλον επιδρά στο γονιδίωμα μέσω πολλαπλών σωματικών μεταλλάξεων.

Τα σύνδρομα πολυποδίασης του γαστρεντερικού σωλήνα αποτελούν ξεχωριστές κλινικές οντότητες, ταξινομημένες σε διακριτές κατηγορίες, οι περισσότερες κληρονομήσιμες και σχετιζόμενες με αυξημένο κίνδυνο ΚΠΕ. Η ταξινόμησή τους βασίζεται στον ιστολογικό τύπο των πολυπόδων και στις κλινικές εκδηλώσεις. Η πρόοδος της γενετικής έχει επιτρέψει τόσο την αναγνώριση των υπεύθυνων γονιδίων όσο και την κατανόηση της σχέσης του ενός συνδρόμου με το άλλο.

6Α) Σύνδρομο αδενωματώδους πολυποδίασης

Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP) [Κλασσική – εξασθενημένη]

Η FAP είναι το δεύτερο συχνότερα κληρονομούμενο σύνδρομο ΚΠΕ με επίπτωση 1:10.000. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση εκατοντάδων έως χιλιάδων αδενωμάτων στο παχύ έντερο με έναρξη κατά την πρώιμη εφηβική ηλικία και αναπόφευκτη ανάπτυξη ΚΠΕ στους ασθενείς χωρίς θεραπεία. Η μέση ηλικία εμφάνισης ΚΠΕ είναι τα 39 έτη. Η εξασθενημένη μορφή του συνδρόμου χαρακτηρίζεται από 69% δια βίου κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ, από την παρουσία 30 κατά μέσο όρο αδενωματωδών πολυπόδων και την ανάπτυξη ΚΠΕ σε μεγαλύτερη ηλικία. Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις του συνδρόμου περιλαμβάνουν την παρουσία πολυπόδων στο ανώτερο πεπτικό, την ανάπτυξη οστεωμάτων – κυρίως στο κρανίο και την κάτω γνάθο -, επιδερμοειδών κύστεων, ινωμάτων, οδοντικών ανωμαλιών, δεσμοειδών όγκων και συγγενούς υπερτροφίας του μελαγχρωστικού επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς. Γαστρικοί αδενικοί πολύποδες θόλου ανευρίσκονται στο 50% των ασθενών όπως και αδενωματώδεις, αν και είναι λιγότερο συχνόι από τους πρώτους. Αδενωματώδεις πολύποδες παρατηρούνται σε > 50% των ασθενών, ιδία στη β' και γ' μοίρα. Ο καρκίνος στο δωδεκαδάκτυλο είναι η δεύτερη συχνότερη κακοήθεια σε ασθενείς με FAP, με δια βίου κίνδυνο 4% - 12%.

Και οι δυο μορφές του συνδρόμου προκαλούνται από germline μεταλλάξεις στο APC γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης που αποτελεί μέρος της Wnt οδού μετάδοσης του σήματος. Η θέση της μετάλλαξης επί του APC σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου και την παρουσία και/ή τη συχνότητα καλοηθών ευρημάτων πχ δεσμοειδών βλαβών.

Η διάγνωση στηρίζεται στην ανεύρεση τουλάχιστον 100 αδενωμάτων στο παχύ έντερο, αν και σε νεαρότερες ηλικίες μπορεί να υπάρχουν λιγότεροι πολύποδες. Η παρουσία εξωεντερικών βλαβών συμβάλλει, επίσης, στη διάγνωση. Η υποψία εξασθενημένης μορφής της νόσου τίθεται με την ύπαρξη ≥ 10 αλλά < 100 αδενωμάτων σε άτομο ηλικίας άνω των 40 ή 50 ετών. Ο γενετικός έλεγχος επιβεβαιώνει τη διάγνωση και βοηθά στην αναγνώριση συγγενών σε κίνδυνο. Οι ασθενείς σε κίνδυνο ή με διαγνωσμένη FAP πρέπει να ελέγχονται με κολοσκόπηση ανά 1-2 έτη, με ηλικία έναρξης τα 10-12 χρόνια. Η κολεκτομή συστήνεται όταν υπάρχουν > 20 αδενώματα, σε

αδενώματα > 1cm ή σε περίπτωση προχωρημένης ιστολογικής εικόνας. Ολική πρωκτοκολεκτομή με ειλεοπρωκτική αναστόμωση και δημιουργία τεχνητής ληκύθου επιβάλλεται όταν ανευρίσκεται μεγάλος αριθμός αδενωμάτων στην περιοχή του ορθού ενώ προτείνεται η διατήρηση του ορθού σε περιπτώσεις που υπάρχουν ελάχιστα ή καθόλου αδενώματα σε αυτό. Στην περίπτωση παραμονής ορθικού ιστού απαιτείται ετήσιος ή τακτικότερος ενδοσκοπικός έλεγχος. Το 33% περίπου των ασθενών με διατήρηση ορθού θα χρειασθούν ολική πρωκτοκολεκτομή σε δεύτερο χρόνο λόγω της διάχυτης ανάπτυξης πολυπόδων. Πολύ λίγα στοιχεία υπάρχουν όσον αφορά τη χρήση ΜΣΑΦ ως πρωτογενή θεραπεία για τη FAP ή για την καθυστέρηση της χειρουργικής αντιμετώπισης. Η χρήση αυτή θα πρέπει, επί του παρόντος, να περιορίζεται σε ερευνητικές μελέτες. Στην εξασθενημένη μορφή FAP, οι ασθενείς θα πρέπει να υποβάλλονται σε προληπτικό έλεγχο με κολοσκόπηση ανά 1-2 έτη, ο οποίος θα πρέπει να ξεκινά στην όψιμη εφηβεία. Περί το 33% αυτών αντιμετωπίζονται επαρκώς με τον προληπτικό ενδοσκοπικό έλεγχο και την πολυποδεκτομή – ένεκα του μικρού αριθμού πολυπόδων. Το 66% πάντως, θα χρειασθεί κολεκτομή - με ειλεορθική αναστόμωση συνήθως. Σε αυτούς τους ασθενείς απαιτείται ετήσιο follow-up και σπανιότατα πρωκτεκτομή σε β' χρόνο.

Για όλους τους ασθενείς με FAP (κλασσική ή εξασθενημένη), συστήνεται ενδοσκοπικός έλεγχος ανώτερου πεπτικού κάθε 1-3 έτη, με συμπληρωματικό έλεγχο των ύποπτων βλαβών στο φύμα του Vater με ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα. Ο έλεγχος θα πρέπει να άρχεται στα 25-30 χρόνια και επιβάλλεται βιοψία ή/και αφαίρεση των πολυπόδων, ανάλογα με το μέγεθος και την εμφάνιση. Τα κριτήρια σταδιοποίησης του Spigelman για την αδενωμάτωση του δωδεκαδακτύλου δίδουν τις κατευθυντήριες γραμμές για τα κατάλληλα μεσοδιαστήματα του follow-up. Σε βάθος χρόνου, $\geq 20\%$ των ασθενών θα χρειασθούν ενδοσκοπική ή χειρουργική αντιμετώπιση των αδενωμάτων του δωδεκαδακτύλου ή του φύματος του Vater. Από τους αδενικούς πολύποδες του θόλου θα πρέπει να λαμβάνονται βιοψίες – ιδίως εάν είναι ευμεγέθεις ή ερυθρηματώδεις. Γαστρεκτομή απαιτείται σπάνια και συνήθως σε παρουσία σοβαρής δυσπλασίας. Έλεγχος της θυρεοειδικής λειτουργίας σε ετήσια βάση (αντικειμενική εξέταση, υπερηχογράφημα) θεωρείται επιβεβλημένος λόγω του αυξημένου κινδύνου που ελλοχεύει σε αυτούς τους ασθενείς για καρκίνο στο θυρεοειδή (54).

Το σύνδρομο Gardner είναι μια οικογενής νόσος που χαρακτηρίζεται από την παρουσία οστεωμάτων και πολυπόδων στο γαστρεντερικό σωλήνα σε συνδυασμό με ποικίλους καλοήθεις όγκους στα μαλακά μόρια (επιδερμοειδείς κύστες, ινώματα, λιπώματα) και άλλες εξωεντερικές εκδηλώσεις (δεσμοειδείς όγκοι, νεοπλασίες θυρεοειδούς, επινεφριδίων, ήπατος, χοληφόρων). Τόσο το συγκεκριμένο σύνδρομο όσο και το FAP προέρχονται από μεταλλάξεις του APC γονιδίου. Οι οστικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν οστεώματα της κάτω γνάθου, του κρανίου και των μακρών οστών, εξοστώσεις, και οδοντικές ανωμαλίες όπως οι κύστες στην κάτω γνάθο, οι υπεράριθμοι οδόντες ή οι ενσφηνωμένοι οδόντες. Οστεώματα στην κάτω γνάθο ανευρίσκονται, βέβαια, και στο 90% των ασθενών με FAP χωρίς άλλα σημεία συνδρόμου Gardner. Επειδή τα οστεώματα δεν υφίστανται κακοήγη εξαλλαγή, η αφαίρεσή τους θα πρέπει να γίνεται για αισθητικούς ή συμπτωματικούς λόγους. Οι δεσμοειδείς όγκοι (διάχυτη μεσεντέρια ινωμάτωση) αποτελούν τη δεύτερη – μετά το μεταστατικό καρκίνο – θανατηφόρο

επιπλοκή. Προκαλούν απόφραξη στον πεπτικό σωλήνα και αποκλείουν αρτηρίες, φλέβες ή ουρητήρες. Σχετίζονται με θνησιμότητα 10% - 50%. Όταν είναι εντοπισμένοι ή προσεγγίσιμοι ανταποκρίνονται σε ακτινοθεραπεία ενώ η χημειοθεραπεία περιστασιακά μπορεί να έχει επιτυχία (13, 26).

Το σύνδρομο Turcot χαρακτηρίζεται από οικογενή πολυποδίαση του παχέος εντέρου σε συνδυασμό με πρωτοπαθείς όγκους του ΚΝΣ (μυελοβλάστωμα, γλοιοβλάστωμα). Φαινοτυπικά, εμφανίζει μια ευρεία ποικιλία: εκδηλώσεις από το παχύ έντερο που μπορεί να περιλαμβάνουν από ένα απλό αδένωμα μέχρι διάχυτη αδενωμάτωση, και εγκεφαλικοί όγκοι με διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους. Σε κάθε περίπτωση, επιβάλλεται προληπτικός έλεγχος όλων των μελών της οικογένειας του ασθενούς με κολοσκόπηση και απεικονιστικές εξετάσεις του εγκεφάλου(13).

6B) Σύνδρομο αμαρτωματώδους πολυποδίασης

Σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS)

Η επωνυμία σύνδρομο Peutz-Jeghers δόθηκε για πρώτη φορά το 1954 από τον Bruwer και συν. με βάση την εργασία του Peutz ο οποίος το 1921 περιέγραψε την περίπτωση μιας οικογένειας με πολυποδίαση του γαστρεντερικού σωλήνα και μελαγχρωστικές βλάβες σε βλεννογόνους και του Jeghers που το 1949 καθόρισε τη συνύπαρξη αυτών των βλαβών ως ξεχωριστή κλινική οντότητα. Η επίπτωση του συνδρόμου εκτιμάται σε 1 ανά 50000 έως 1 ανά 200000 γεννήσεις (55). Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και οφείλεται σε germline μετάλλαξη του STK11/LKB1, ενός γονιδίου που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19p (13).

Από το γαστρεντερικό σωλήνα χαρακτηριστική εκδήλωση του συνδρόμου είναι η παρουσία αμαρτωματωδών πολυπόδων στο λεπτό έντερο(96%). Αμαρτωματώδεις πολύποδες στο στόμαχο και το παχύ έντερο ανευρίσκονται στο 25% - 30% των περιπτώσεων, αντίστοιχα (54). Άλλες εξωεντερικές εντοπίσεις των αμαρτωματωδών πολυπόδων είναι η χοληδόχος κύστη, οι βρόγχοι, η ουροδόχος κύστη και οι ουρητήρες (55). Τα συμπτώματα από το πεπτικό άρχονται νωρίς κατά την παιδική ηλικία ή την εφηβεία (σε ποσοστά 33% και 50% στην ηλικία των 10 και 20 ετών αντίστοιχα). Περιλαμβάνουν απόφραξη του λεπτού εντέρου ή εγκολεασμό, καταστάσεις που μπορεί να κάνουν την εμφάνισή τους κι από τη βρεφική ηλικία. Οξεία αιμορραγία από το ανώτερο πεπτικό ή χρόνια αποβολή αίματος στα κόπρανα αποτελούν, επίσης, πιθανές επιπλοκές της νόσου (13,57). Οι πλέον σταθερές εξωεντερικές εκδηλώσεις του συνδρόμου είναι οι εναποθέσεις μελανίνης κυρίως πέριξ του στόματος, στη μύτη, στα χείλη, στο βλεννογόνο των παρειών, στα χέρια και στα πόδια όπως και στις γεννητικές και περιπρωκτικές περιοχές (55). Παρατηρούνται στο 95% των ασθενών και μπορεί να αποτελούν το πρώτο σημείο της νόσου. Οι μελαγχρωστικές κηλίδες έχουν καφέ προς πρασινόμαυρο χρώμα που συνήθως εξασθενεί κατά την εφηβεία, εμμένοντας μόνον στο στοματικό βλεννογόνο. Ιστολογικά πρεσβεύουν αυξημένες συγκεντρώσεις μελανίνης στα βασικά κύτταρα, πιθανώς λόγω μιας φλεγμονώδους παρεμπόδισης μετακίνησης της μελανίνης από τα μελανοκύτταρα στα κερατινοκύτταρα (13,55). Κλινική διάγνωση του συνδρόμου Peutz-Jeghers γίνεται σε άτομα με τουλάχιστον 1 από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: ≥ 2 αμαρτωματώδεις πολύποδες στο λεπτό έντερο, οιοσδήποτε αριθμός αμαρτωματωδών πολυπόδων σε άτομο με οικογενειακό ιστορικό συνδρόμου Peutz-Jeghers, τυπικές μελαγχρωστικές κηλίδες σε δέρμα και βλεννογόνους

ατόμου με οικογενειακό ιστορικό του συνδρόμου και τέλος οιοσδήποτε αριθμός αμαρτωματώδων πολυπόδων σε συνδυασμό με μελαγχρωστικές βλάβες βλεννογόνων – δέρματος (55).

Η μέση ηλικία διάγνωσης του συνδρόμου είναι τα 23-26 έτη.

Η παρουσία καρκίνων τόσο στο γαστρεντερικό σωλήνα όσο και σε άλλα όργανα (γονάδες, μαστός) είναι συχνή σε ασθενείς με Peutz-Jeghers, με μέση ηλικία διάγνωσης αυτών τα 40-50 έτη (13). Ο δια βίου κίνδυνος για την ανάπτυξη καρκίνου είναι 81% - 93%. Ο αθροιστικός κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ είναι 39%, με κοντινά ποσοστά και για τον γαστρικό και παγκρεατικό καρκίνο. Καρκινώματα μπορεί να παρουσιαστούν επίσης στα χοληφόρα, στη χοληδόχο κύστη, στο μαστό, στις ωοθήκες, στους όρχεις και στη μήτρα (13,54).

Η επιτήρηση των ασθενών με PJS έχει δύο κύριους στόχους: την έγκαιρη εντόπιση πολυπόδων με επακόλουθο τη μείωση των επιπλοκών τους (πχ εγκολεασμός, απόφραξη, αιμορραγία) σε νεαρότερες ηλικίες και την ανίχνευση καρκίνου σε πρωιμότερο στάδιο στους πλέον ηλικιωμένους ασθενείς (55).

Η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με PJS περιλαμβάνει την ενδοσκοπική πολυπεκτομή κατά τη διάρκεια της ενδοσκόπησης ανώτερου ή κατώτερου πεπτικού - χωρίς πάντως να είναι απόλυτα σαφές εάν αυτή συμβάλλει στη μείωση της εμφάνισης καρκίνου αφού η πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής των αμαρτωματώδων πολυπόδων του συνδρόμου δεν είναι καθορισμένη. Η ανακάλυψη, επίσης, της εντεροσκόπησης με διπλό μπαλόνι καθώς και της ασύρματης ενδοσκοπικής κάψουλας έχει επιτρέψει τον άμεσο οπτικό έλεγχο του αυλού του λεπτού εντέρου και στην πρώτη περίπτωση και την ενδοσκοπική αφαίρεση πολυπόδων. Λαπαροτομία εφαρμόζεται σε ασθενείς με PJS είτε ως επείγουσα επέμβαση στην περίπτωση απόφραξης/εγκολεασμού ή για την εκλεκτική αφαίρεση συμπτωματικών και μεγάλων πολυπόδων οι οποίοι δεν μπορούν να αφαιρεθούν ενδοσκοπικά. Συστήνεται, επίσης, και η διενέργεια διεγχειρητικής εντεροσκόπησης σε αυτή την περίπτωση, με δεδομένο το γεγονός της προσεκτικότερης επισκόπησης του εντερικού αυλού μέσω εντεροτομής, που επιτρέπει την ανεύρεση και αφαίρεση πολυπόδων αποφεύγοντας τοιουτοτρόπως τις πολλαπλές εντεροτομές και τον κίνδυνο εμφάνισης συνδρόμου βραχέος εντέρου καθώς και την πιθανότητα νέας/ων λαπαροτομίας/ών. Έχει προταθεί, επίσης, η προφυλακτική χορήγηση διαφόρων σκευασμάτων (ΜΣΑΦ, μετφορμίνη, αναστολείς αρωματάσης) για τη μείωση της εμφάνισης πολυπόδων, χωρίς όμως εφαρμογή στην καθ' ημέρα κλινική πράξη. Για τη βελτίωση των μελαγχρωστικών βλαβών, υπάρχουν αναφορές επιτυχούς εφαρμογής παλμικού φωτός και θεραπείας laser. Οι τεχνικές αυτές, πάντως, θα πρέπει να φυλάσσονται προς χρήση σε περιπτώσεις με σοβαρή ψυχολογική επιβάρυνση συνεπεία των δερματικών αλλοιώσεων (13,55).

Σε αντίθεση με το σύνδρομο Peutz-Jeghers, το σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης δεν έχει τυπικά αντικειμενικά ευρήματα που να κατευθύνουν στη διάγνωση. Το κύριο χαρακτηριστικό του συνδρόμου είναι η παρουσία πολλαπλών πολυπόδων, κυρίως στο παχύ έντερο, αλλά και στο στομάχι και στο λεπτό έντερο (54). Οι πολύποδες έχουν ομαλή επιφάνεια και καλύπτονται από φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο (13).

Το σύνδρομο αφορά συνήθως οικογένειες παρότι έχουν αναφερθεί νέες μεταλλάξεις σε ασθενείς με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και οφείλεται σε germline μεταλλάξεις

είτε στο SMAD4 ή στο BMPR1A γονίδιο. Τα κριτήρια διάγνωσης του συνδρόμου είναι (αρκεί ένα για τη διάγνωση) : τουλάχιστον 5 νεανικοί πολύποδες στο παχύ έντερο, νεανικοί πολύποδες καθόλο το μήκος του πεπτικού σωλήνα ή οποιοσδήποτε αριθμός νεανικών πολυπόδων με οικογενειακό ιστορικό της νόσου (13,54).

Η τυπική εμφάνιση της νόσου περιλαμβάνει αιμορραγία από το πεπτικό, εγκολεασμό ή απόφραξη. Η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι τα 4,5 και τα 9,5 έτη για τις μη οικογενείς και για τις οικογενείς μορφές, αντίστοιχα (13). Συγγενείς ανωμαλίες από άλλα όργανα βρίσκονται στο 15% των περιπτώσεων.

Αν και οι νεανικοί πολύποδες δεν θεωρούνται από μόνοι τους νεοπλασματικοί, η σύγχρονη ύπαρξη αδενωμάτων ή η παρουσία μικτών νεανικών-αδενωματωδών πολυπόδων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ είναι 39% και γαστρικού καρκίνου 21% στους ασθενείς με πολλαπλούς γαστρικούς πολύποδες με μικτά χαρακτηριστικά (νεανικοί-υπερπλαστικοί-αδενωματώδεις)(54).

Η διάγνωση τίθεται με κολοσκόπηση. Ο προληπτικός έλεγχος αρχίζει στην ηλικία των 15 ετών αν τα συμπτώματα δεν έχουν εμφανισθεί νωρίτερα και πρέπει να επαναλαμβάνεται ανά 1-3 χρόνια. Ο προληπτικός έλεγχος πρέπει να περιλαμβάνει και ασυμπτωματικούς συγγενείς. Αν η κολοσκόπηση δείξει πολύποδες, θα πρέπει να ακολουθήσει ενδοσκόπηση ανώτερου πεπτικού. Εν γένει, οι νεανικοί πολύποδες πρέπει να αφαιρούνται λόγω της τάσης τους να αιμορραγούν και να προκαλούν απόφραξη. Στην περίπτωση ύπαρξης πολυάριθμων πολυπόδων συστήνεται κολεκτομή. Σπανιότερα σύνδρομα είναι η νόσος του Cowden (σύνδρομο πολλαπλών αμαρτωμάτων) και το σύνδρομο Bannayan-Ruvalcaba-Riley.

Η νόσος του Cowden – εξαιρετικά σπάνια σε συχνότητα - χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμαρτωματωδών πολυπόδων στο στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο σε συνδυασμό με εξωεντερικές εκδηλώσεις όπως αμαρτώματα στο δέρμα και στο στόμα, ινοκυστική νόσο και καρκίνο στο μαστό, μη τοξική βρογχοκήλη και καρκίνο του θυρεοειδούς. Το κλασικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η παρουσία πολλαπλών τριχλημμωμάτων στο πρόσωπο, ιδία πέριξ των ματιών, της μύτης και του στόματος. Συμπτώματα από το πεπτικό καθώς και ΚΠΕ παρουσιάζονται σπανιότατα.

Στο σύνδρομο Bannayan-Ruvalcaba-Riley χαρακτηριστική είναι η παρουσία αμαρτωματωδών πολυπόδων στον πεπτικό σωλήνα συνδυαστικά με μακροκεφαλία, καθυστέρηση και άλλες ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη, μελαγχρωστικούς σπίλους στο πέος και θυρεοειδίτιδα. Το σύνδρομο κληρονομείται πιθανόν με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα (13).

6Γ) Σύνδρομο υπερπλαστικής πολυποδίασης (HPS)

Χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών και/ή ευμεγεθών πολυπόδων στο παχύ έντερο. Το σύνδρομο είναι εξαιρετικά σπάνιο και η στοιχειοθέτηση κληρονομικής επιβάρυνσης φαίνεται να είναι ασθενής, παρότι έχουν προταθεί τόσο ο επικρατών όσο και ο υπολειπόμενος τρόπος μεταβίβασης της νόσου. Περιέργως, επίσης, ασθενείς με διαλλαλικές MUTYH μεταλλάξεις, περιστασιακά έχει φανεί ότι πληρούν τα κριτήρια διάγνωσης του συνδρόμου. Οι περισσότερες περιπτώσεις, πάντως, είναι σποραδικές με μόνο το 5% των ασθενών να εμφανίζει οικογενειακό ιστορικό. Σύμφωνα με τον WHO, τα κριτήρια για τη διάγνωση του συνδρόμου είναι τα εξής: πολλαπλοί (30 ή

περισσότεροι) υπερπλαστικοί πολύποδες οιοδήποτε μεγέθους σε όλο το παχύ έντερο; ≥ 5 υπερπλαστικοί πολύποδες κεντρικότερα του σιγμοειδούς κόλου όπου οι δύο τουλάχιστον να έχουν διάμετρο $> 10\text{mm}$; ή τουλάχιστον 1 υπερπλαστικός πολύποδας στο παχύ έντερο συγγενούς α΄ βαθμού ατόμου με διαγνωσμένο σύνδρομο (13,54).

Οι ασθενείς με σύνδρομο υπερπλαστικής πολυποδίασης έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ, συχνότερα στην ηλικία των 50 ή 60 ετών. Περί το 37% - 69% των περιπτώσεων ΗΡS έχουν σχετισθεί με σύγχρονο ΚΠΕ. Μάλιστα, οι καρκινικές βλάβες έχουν μια τάση εμφάνισης στο δεξιό ήμισυ του παχέος εντέρου.

Σήμερα, είναι κοινά αποδεκτό ότι συνυπάρχει μια οδός ανάπτυξης οδοντωτής νεοπλασίας ομού μετά του μοντέλου εξέλιξης από αδένωμα σε καρκίνωμα. Η άθροιση σωματικών μεταλλάξεων σε άμισχους οδοντωτούς πολύποδες – ενεργοποίηση BRAF μεταλλάξεων και ευρεία μεθυλίωση των CpG νησιδίων, με ή χωρίς MSI- αποτελεί το σημαντικότερο γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη καρκινωμάτων. Απαιτείται, όμως, περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με το ρόλο άλλων παραγόντων, πχ τρόπου ζωής όπως το κάπνισμα, που πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεση του συνδρόμου.

Σε ασθενείς χωρίς καρκίνο τα συμπτώματα απουσιάζουν και η διάγνωση γίνεται τυχαία κατά τη διάρκεια προληπτικού ελέγχου με κολοσκόπηση.

Παρά την απουσία κατευθυντηρίων οδηγιών σχετικά με τη διεξαγωγή τακτικού ελέγχου των ασθενών, η διενέργεια ολικής κολοσκόπησης ανά 1-2 χρόνια φαίνεται αρκετά λογική ως πρόταση με δεδομένο τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου και ίδια στο δεξί κόλο. Καρκίνος μπορεί να υπάρχει και σε πολύποδες $< 5\text{mm}$, κι έτσι δεν θα πρέπει να αφαιρούνται μόνον οι ευμεγέθεις βλάβες. Οι άμισχοι οδοντωτοί πολύποδες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως αδενώματα - από την άποψη κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου – ενώ για εκείνους με μέγεθος $> 5\text{mm}$ που δεν μπορούν να αφαιρεθούν ολικά ενδοσκοπικά ή που έχουν προχωρημένη δυσπλασία θα πρέπει να γίνεται υφολική κολεκτομή. Λόγω ανεπαρκούς γνώσης σχετικά με τον κίνδυνο καρκινογένεσης των συγγενών των ασθενών με ΗΡS, η έναρξη κολοσκοπικού ελέγχου σε αυτούς από την ηλικία των 40 ετών, με επανάληψη ανά 5ετία, φαίνεται ότι αποτελεί μια καλή σύσταση μέχρι νεότερας πληροφόρησης (54).

6Δ) Κληρονομικός μη πολυποδιαστικός καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC ή σύνδρομο Lynch)

Ο HNPCC είναι μια κληρονομούμενη νόσος στην οποία οι καρκινικές βλάβες αναπτύσσονται επί εδάφους αδενωμάτων, χωρίς όμως την ύπαρξη πολυπόδων. Το σύνδρομο κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και είναι υπεύθυνο για το 2% - 4% του συνόλου των ΚΠΕ. Ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ είναι 50% - 80% (13,54).

Στο σύνδρομο Lynch, ο ΚΠΕ εμφανίζεται σε νεαρότερες ηλικίες – συνηθέστερα στην ηλικία των 40 ή 50 ετών (δηλαδή δύο δεκαετίες ενωρίτερα από τον ΚΠΕ στο γενικό πληθυσμό) - και έχει συχνότερα εντόπιση στο δεξιό κόλο σε σύγκριση με τα σποραδικά καρκινώματα και πολλαπλές εστίες. Αφορά οικογένειες με κληρονομικό καρκίνο που περιορίζεται μόνο στο παχύ έντερο (HNPCC τύπου α ή σύνδρομο Lynch I) ή οικογένειες με προδιάθεση, επίσης, για καρκίνο στο γεννητικό σύστημα ή και σε άλλες θέσεις (HNPCC τύπου β ή σύνδρομο Lynch II). Τα αδενώματα του δεξιού κόλου μπορεί να

εμφανίζονται ως επίπεδες ή ελαφρώς επηρμένες βλάβες με εστίες αδενωμάτους εξαλλαγής στο ανώτερο ήμισυ μιας κρύπτης(13). Από ιστολογική άποψη, οι όγκοι είναι βλεννώδεις, πτωχά διαφοροποιημένοι και με αφθονία διηθητικών λεμφοκυττάρων. Χαρακτηρίζονται, επίσης, από υψηλό βαθμό μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H), που είναι ίδιον των καρκίνων που αναπτύσσονται σε έδαφος ελαττωματικών γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA (MMR).

Το σύνδρομο εμφανίζει εξωεντερικές εκδηλώσεις, με κυριότερη τον καρκίνο του ενδομητρίου, του οποίου ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης είναι 40% - 60%, δηλαδή συγκρίσιμος ή και μεγαλύτερος από εκείνον για ΚΠΕ. Το σύνδρομο Lynch ευθύνεται για το 2% όλων των καρκίνων του ενδομητρίου. Άλλοι τύποι καρκίνου που σχετίζονται με το σύνδρομο είναι: γαστρικός, από τις ωσθήκες, από τα χοληφόρα, από το ουροποιητικό, του λεπτού εντέρου, του εγκεφάλου και παγκρεατικός.

Ο HNPCC προκύπτει από germline μετάλλαξη μιας κατηγορίας γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, και περιλαμβάνει τα hMSH2, hMLH1, hMSH6 και hPMS2. Τα MMR γονίδια είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού διορθώνοντας λάθη κατά την αντιγραφή του DNA. Οι μεταλλάξεις που αφορούν τα hMLH1 και hMSH2 γονίδια ευθύνονται για το 90% των περιπτώσεων ενώ το υπόλοιπο 10% οφείλεται στις hMSH6 μεταλλάξεις. Μεταξύ των MMR γονιδίων καταγράφονται διαφορές όσον αφορά τον κίνδυνο ανάπτυξης τόσο ΚΠΕ όσο και άλλων τύπων καρκίνου, με τα μικρότερα ποσοστά επικινδυνότητας να αφορούν τις μεταλλάξεις του hPMS2 γονιδίου (οι οποίες συναντώνται σπανιότατα). Πρόσφατα, σε κάποιες οικογένειες με σύνδρομο Lynch βρέθηκαν germline μεταλλάξεις στο γονίδιο του μορίου προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα (EPCAM), που είναι γνωστό κι ως TACSTD1. Αυτές οι οικογένειες εκδήλωσαν σύνδρομο Lynch με πρώιμη έναρξη και/ή πολλαπλούς καρκίνους, χωρίς όμως μεταλλάξεις στα MMR γονίδια.

Η διάγνωση του συνδρόμου στηρίζεται στη λήψη λεπτομερούς ατομικού και οικογενειακού ιστορικού, στον έλεγχο του καρκίνου με ειδικά αντισώματα για τις 4 πρωτεΐνες επιδιόρθωσης (hMSH2, hMLH1, hMSH6 και hPMS2), σε μοντέλα πρόβλεψης μετάλλαξης (PREMM(1,2), MMRpro, MMRpredict) με βάση το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό καθώς και στο γενετικό έλεγχο για ανεπάρκεια των MMR ενζύμων. Σε κλινικό επίπεδο, η αναγνώριση των ατόμων σε κίνδυνο για ανάπτυξη συνδρόμου Lynch γίνεται με βάση τα κριτήρια του Amsterdam και τις αναθεωρημένες κατευθυντήριες οδηγίες Bethesda (πίνακας 3). Με βάση το γενετικό έλεγχο, ένα 28% των περιπτώσεων με σύνδρομο Lynch χάνονται διαγνωστικά όταν η διάγνωση έχει βασιστεί μόνον στα κριτήρια Bethesda – κυρίως λόγω του χαμηλότερου κινδύνου για ΚΠΕ σε φορείς των hMSH6 και hPMS2 μεταλλάξεων.

Η έγκαιρη αναγνώριση των ασθενών με σύνδρομο Lynch έχει ιδιαίτερη σημασία λόγω της πρωιμότερης εμφάνισης και της υψηλής διεισδυτικότητας του ΚΠΕ σε αυτούς. Η στενή επιτήρηση τέτοιων ασθενών μειώνει την επίπτωση τόσο του ΚΠΕ όσο και των σχετιζομένων με αυτόν θανάτων.

Η διενέργεια κολοσκόπησης ανά 3 έτη μειώνει – όπως έχει φανεί – τον κίνδυνο για ΚΠΕ κατά >50% και προλαμβάνει τους σχετικούς θανάτους. Ο κίνδυνος αναμένεται να υποστεί περαιτέρω μείωση όταν το μεσοδιάστημα του ενδοσκοπικού ελέγχου

ελαττώνεται στα 1 – 2 χρόνια και για αυτό το λόγο συστήνεται η έναρξη προληπτικού ενδοσκοπικού ελέγχου στην ηλικία των 20 – 25 ετών με επανάληψη αυτού ανά 1-2 έτη.

Πίνακας 3: Κριτήρια Amsterdam και αναθεωρημένες οδηγίες Bethesda (Jasperson K, Tuohy T, Neklason D, Burt R. Hereditary and Familial Colon Cancer. Gastroenterology 2010; 138: 2044-58)

ΚΡΙΤΗΡΙΑ AMSTERDAM ΚΑΙ ΑΝΑΘΕΩΡΗΜΕΝΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ BETHESDA
<p>Κριτήρια Amsterdam I <u>Τουλάχιστον τρεις συγγενείς με ΚΠΕ - πρέπει να ισχύουν όλα τα κατωτέρω:</u> 1 ασθενής έχει α' βαθμού συγγένεια με τους άλλους 2 Προσβολή 2 τουλάχιστον διαδοχικών γενεών Τουλάχιστον 1 ΚΠΕ διεγνωσμένος πριν την ηλικία των 50 Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση έχει αποκλεισθεί</p>
<p>Κριτήρια Amsterdam II <u>Τουλάχιστον τρεις συγγενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, ενδομητρίου, λεπτού εντέρου, ουρητήρα ή νεφρικής πυέλου - πρέπει να ισχύουν όλα τα κατωτέρω:</u> 1 ασθενής έχει α' βαθμού συγγένεια με τους άλλους 2 Προσβολή 2 τουλάχιστον διαδοχικών γενεών Τουλάχιστον 1 καρκίνος διεγνωσμένος πριν την ηλικία των 50 Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση έχει αποκλεισθεί</p>
<p>Αναθεωρημένες οδηγίες Bethesda <u>Απαιτείται τουλάχιστον 1 από τα κατωτέρω:</u> ΚΠΕ διεγνωσμένος σε άτομο < 50 ετών Παρουσία σύγχρονου, μετάχρονου ΚΠΕ, ή άλλου καρκίνου σχετιζόμενου με σύνδρομο Lynch, ανεξαρτήτως ηλικίας ΚΠΕ διεγνωσμένος σε άτομο < 60 ετών με ιστολογία MSH-H ΚΠΕ διεγνωσμένος σε άτομο και σε ≥ 1 συγγενείς α' βαθμού με ένα καρκίνο σχετιζόμενο με σύνδρομο Lynch, με τουλάχιστον 1 από τους καρκίνους να έχει διαγνωσθεί πριν την ηλικία των 50 ΚΠΕ διεγνωσμένος σε άτομο και σε ≥ 2 συγγενείς α' ή β' βαθμού με καρκίνο σχετιζόμενο με σύνδρομο Lynch ανεξαρτήτως ηλικίας</p>

Η μακροχρόνια χρήση ασπιρίνης φαίνεται, επίσης, ότι ελαττώνει την επίπτωση ΚΠΕ στους ασθενείς με σύνδρομο Lynch και πιθανόν να υπάρξει σύσταση για προληπτική χορήγησή της στο εγγύς μέλλον.

Στην περίπτωση εμφάνισης ΚΠΕ συστήνεται υφολική κολεκτομή με ειλεορθική αναστόμωση ή τμηματική εκτομή και στη συνέχεια ενδοσκοπική επιτήρηση του ορθού ή του εναπομείναντος κόλου ανά έτος. Στις γυναίκες με σύνδρομο Lynch που βρίσκονται σε μη αναπαραγωγική ηλικία θα πρέπει να συζητείται το ενδεχόμενο διενέργειας προφυλακτικής υστερεκτομής και εκτομής εξαρτημάτων άμφω για τη μείωση της επίπτωσης καρκίνου του ενδομητρίου και των ωοθηκών. Ο προληπτικός έλεγχος για αυτές τις κακοήθειες δεν φαίνεται αρκετά αποτελεσματικός κι έτσι η έναρξη ετήσιου προληπτικού ελέγχου στην ηλικία των 30 ετών με προληπτική χειρουργική επέμβαση στα 40 φαίνεται ότι προσφέρει το υψηλότερο καθαρό όφελος σε επίπεδο ποιοτικής επιβίωσης (54).

7. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Οι ΚΠΕ ξεκινούν ως ενδοβλεννογονικές επιθηλιακές βλάβες, συνήθως επί εδάφους αδενωματωδών πολυπόδων ή αδένων. Καθώς αυξάνονται σε μέγεθος, διαπερνούν τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα του εντερικού τοιχώματος και διηθούν αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία, με αποτέλεσμα την επέκταση της νόσου σε επιχώριους λεμφαδένες, εγγύς ανατομικές δομές και απομακρυσμένες θέσεις. Αν και οι ρυθμοί ανάπτυξης των ορθοκολικών καρκίνων ποικίλλουν σημαντικά, οι περισσότεροι εμφανίζουν μακρές περιόδους σιωπηρούς αύξησης πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων. Σε μια μελέτη, ο μέσος χρόνος διπλασιασμού των ΚΠΕ υπολογίσθηκε ακτινολογικά σε 620 ημέρες. Το μοντέλο ανάπτυξης και επέκτασης που θα ακολουθήσει ο κάθε όγκος εξαρτάται από την ανατομία του εκάστοτε τμήματος του εντέρου όπου πρωτοεμφανίζεται καθώς και από την τροφοδότησή αυτού με αίμα και λέμφο. Ο καρκίνος του ορθού αναπτύσσεται συνήθως τοπικά με προοδευτική διήθηση του εντερικού τοιχώματος. Τόσο η διατοιχωματική όσο και η κατά τον επιμήκη άξονα επέκταση του είναι συχνά περιορισμένες ενώ η αιματογενής και λεμφογενής διασπορά του είναι σπάνιες εάν ο όγκος δεν έχει διαπεράσει τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα. Εξαιρεση αποτελούν οι πτωχά διαφοροποιημένοι όγκοι, των οποίων η αιματογενής ή λεμφογενής μετάσταση μπορεί να συμβεί πριν από την εντερική διείσδυση. Λόγω της μειωμένης κινητικότητας και της απουσίας ορογόνου χιτώνα στο ορθό, οι καρκίνοι της συγκεκριμένης περιοχής έχουν την τάση να εξαπλώνονται κατά συνέχεια ιστού. Ένεκα της διπλής παροχής αίματος στο κατώτερο τριτημόριο του ορθού, οι όγκοι που εμφανίζονται σε αυτό πιθανόν να μετασταθούν είτε μέσω της άνω αιμορροϊδικής φλέβας και της πυλαίας κυκλοφορίας στο ήπαρ ή μέσω της μέσης αιμορροϊδικής φλέβας και κάτω κοίλης φλέβας στους πνεύμονες. Η φλεβική παροχέτευση του ανώτερου και μέσου τριτημορίου του ορθού γίνεται μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας, και τοιουτοτρόπως οι καρκίνοι αυτών των τμημάτων μεθίστανται πρωτίστως αιματογενώς στο ήπαρ. Σπάνια, μπορεί να συμβεί αιματογενής διασπορά μέσω πυλαισπονδυλικής κυκλοφορίας με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεταστάσεων σε οσφυϊκούς ή θωρακικούς σπονδύλους. Οι καρκίνοι των υπολοίπων τμημάτων του παχέος εντέρου επεκτείνονται διατοιχωματικά δίδοντας μετάσταση σε επιχώριους ή απομακρυσμένους λεμφαδένες – η λεμφική παροχέτευση ακολουθεί συνήθως παράλληλη πορεία με την αρτηριακή κυκλοφορία στο εκάστοτε εντερικό τμήμα. Το ήπαρ είναι η συνήθης θέση αιματογενούς διασποράς μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας. Οι πνευμονικές μεταστάσεις έπονται συνήθως των ηπατικών (13).

8. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Ο όρος σταδιοποίηση χρησιμοποιείται για την περιγραφή της διαδικασίας εκτίμησης της έκτασης που έχει καταλάβει ο καρκίνος στο ανθρώπινο σώμα. Βασίζεται στην αξιολόγηση του βάθους διείσδυσης του όγκου εντός του εντερικού τοιχώματος, της

διήθησης παρακείμενων δομών ή της διασποράς αυτού σε λεμφαδένες ή απομακρυσμένα όργανα (πχ ήπαρ, πνεύμονες, απομακρυσμένοι λεμφαδένες). Ο καθορισμός του σταδίου αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες πρόβλεψης της πορείας μιας κακοήθειας και του επιτυχούς σχεδιασμού της αντιμετώπισής της.

Υπάρχουν δύο τύποι σταδιοποίησης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, με διαφορές ενίοτε μεταξύ τους:

A) κλινική σταδιοποίηση, η οποία πραγματοποιείται από τον κλινικό ιατρό με βάση αποτελέσματα από την κλινική εξέταση, τη βιοψία και απεικονιστικές μεθόδους
 Β) την παθολογοανατομική σταδιοποίηση, η οποία στηρίζεται στα ίδια στοιχεία με την κλινική συν τα ευρήματα από τη χειρουργική εξαίρεση της νεοπλασίας και χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ακρίβεια (56).

Το 1929, ο Cuthbert Dukes, πρότεινε ένα σύστημα ταξινόμησης των ασθενών με ΚΠΕ σε ομάδες με διαφορετική πρόγνωση και ανάγκη συμπληρωματικής ακτινο-/χημειο-θεραπείας. Έκτοτε, το σύστημα αυτό υποβλήθηκε σε πολλαπλές τροποποιήσεις, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της προγνωστικής του αξίας για τον ορθοκολικό καρκίνο (πίνακας 4).

Πίνακας 4 . Σταδιοποίηση κατά Dukes

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ DUKES	
Στάδιο A	Ο όγκος περιορίζεται στο εντερικό τοίχωμα – N(-)
Στάδιο B	Ο όγκος διηθεί το εντερικό τοίχωμα – επέκταση στο περικολικό λίπος – N(-)
Στάδιο C	Διήθηση λεμφαδένων
Στάδιο D	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Η πλέον υιοθετημένη τροποποίηση του συστήματος Dukes είναι αυτή των Astler – Coller το 1954. Με βάση τη συγκεκριμένη ταξινόμηση υπάρχουν τα εξής στάδια: A, όγκοι που περιορίζονται στο βλεννογόνο; B1, όγκοι που εκτείνονται στο μυϊκό χιτώνα χωρίς να τον διαπερνούν; B2, όγκοι που διαπερνούν το μυϊκό χιτώνα χωρίς όμως λεμφαδενική συμμετοχή; C, όγκοι με τοπική λεμφαδενική διήθηση. Με τροποποίηση του 1967 προστέθηκε άλλο ένα στάδιο, το D, για την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων ενώ το Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) το 1975 πρότεινε την υποδιαίρεση του σταδίου C σε δύο επιμέρους: το C1, για όγκους με διήθηση 1 έως 4 περιοχικών λεμφαδένων και C2, για εκείνους με διήθηση περισσότερων από 4 περιοχικών λεμφαδένων.

Σήμερα, το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα σταδιοποίησης είναι το TNM, το οποίο εισήχθη το 1959 και βελτιώνεται συνεχώς από την American Joint Committee on Cancer (AJCC) και την International Union Against Cancer (UICC) σε μια προσπάθεια επίτευξης μιας μεθοδικής και ενιαίας ταξινόμησης των ορθοκολικών καρκίνων. (34) Αυτά τα συστήματα ταξινομούν το βάθος διείσδυσης του πρωτοπαθούς όγκου (T), την κατάσταση των επιχώριων λεμφαδένων (N) καθώς και την παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Οι υποκατηγορίες αυτών των παραμέτρων έχουν ως εξής :

T υποκατηγορίες

Tx: καμία περιγραφή της έκτασης του πρωτοπαθούς όγκου λόγω ελλιπούς παροχής πληροφοριών

Tis: ο όγκος δεν επεκτείνεται πέραν της βλεννογονικής στιβάδας. Οι όγκοι αυτού του σταδίου αναφέρονται και ως καρκινώματα in situ ή ενδοβλεννογονικοί καρκίνοι.

T1: ο όγκος επεκτείνεται στον υποβλεννογόνο χιτώνα

T2: ο όγκος επεκτείνεται στον μυϊκό χιτώνα

T3: ο όγκος διηθεί τον ορογόνο χιτώνα αλλά δεν επεκτείνεται σε παρακείμενες δομές και όργανα.

T4: ο όγκος διαπερνά το περιτόναιο ή διηθεί απ'ευθείας άλλα όργανα

N υποκατηγορίες

Nx: καμία περιγραφή λεμφαδενικής συμμετοχής λόγω ανεπαρκούς πληροφόρησης

N0: δεν ανευρίσκεται διήθηση λεμφαδένων

N1: ανεύρεση καρκινικών κυττάρων σε 1 έως 3 επιχώριους λεμφαδένες

N2: ανεύρεση καρκινικών κυττάρων σε 4 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες.

M υποκατηγορίες

Mx: καμία περιγραφή απομακρυσμένης διασποράς του καρκίνου λόγω ανεπαρκούς παροχής πληροφοριών

M0: καμία απομακρυσμένη μετάσταση δεν ανευρίσκεται

M1: ανευρίσκεται απομακρυσμένη διασπορά της νόσου.

Με βάση τη συγκεκριμένη μέθοδο σταδιοποίησης – η οποία περιγράφει την πλήρη έκταση της νόσου – οι ασθενείς με ΚΠΕ κατατάσσονται σε πέντε στάδια. Η σταδιοποίηση καθώς και οι αντίστοιχες 5ετείς επιβιώσεις για έκαστο στάδιο φαίνονται στους πίνακες 5 και 6 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται, σε προχωρημένα στάδια παρατηρούνται δυσμενέστερες επιβιώσεις, με μοναδική εξαίρεση τους ασθενείς σταδίου IIIa οι οποίοι εμφανίζουν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης από εκείνους που βρίσκονται σε στάδιο IIb, πιθανόν λόγω του αρνητικού αντίκτυπου που έχει η διήθηση του ορογόνου χιτώνα στην επιβίωση, ακόμη και όταν υπάρχουν λεμφαδένες ελεύθεροι νόσου(13).

Πίνακας 5. Σταδιοποίηση κατά TNM του καρκίνου του παχέος εντέρου (AJCC) (Compton C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. Mod Pathol 2003; 16(4): 376-88)

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ			
Στάδιο	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1 ή T2	N1	M0
IIIB	T3 ή T4	N1	M0
IIIC	οιοδήποτε T	N2	M0
IV	οιοδήποτε T	οιοδήποτε N	M1

Πίνακας 6. Πενταετής επιβίωση του καρκίνου του παχέος εντέρου (AJCC) (Compton C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. Mod Pathol 2003; 16(4): 376-88)

ΠΕΝΤΑΕΤΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (TNM ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ)	
Στάδιο	5ετης επιβίωση, %
I	93,2
IIA	84,7
IIB	72,2
IIIA	83,4
IIIB	64,1
IIIC	44,3
IV	8,1

9. ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου θα πρέπει να θεωρείται μια ετερογενής, πολυσταδιακή νόσος δεδομένου ότι όγκοι με πανομοιότυπη ιστολογία πιθανόν να έχουν και διαφορετική πρόγνωση και διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία (57).

Η πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου καθορίζεται κυρίως από κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και μοριακούς δείκτες.

Η χρησιμότητά τους έγκειται στην πρόβλεψη της κλινικής έκβασης των ασθενών αλλά και στο σχεδιασμό της καταλληλότερης θεραπείας (τόσο προ- όσο και μετεγχειρητικά) και του follow up ελέγχου (13).

Υφίσταται αυξημένη προσδοκία ότι οι μοριακοί παράγοντες κινδύνου που έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα καθώς και εκείνοι που βρίσκονται υπό έρευνα θα

αποτελέσουν το πρελούδιο μιας στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης με βάση μοριακούς δείκτες. Μια τέτοια στοχευμένη θεραπεία θα μπορούσε να μπλοκάρει τα ανώμαλα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται σε συγκεκριμένους μοριακούς τύπους ΚΠΕ (58).

9Α) Κλινικοπαθολογικοί δείκτες

α) Κλινικά χαρακτηριστικά

Η διάγνωση του ΚΠΕ σε ασυμπτωματικούς ασθενείς έχει συσχετισθεί με βελτιωμένη πρόγνωση ενώ η διάρκεια των συμπτωμάτων δεν φαίνεται να έχει άμεση συσχέτιση. Ορισμένα συμπτώματα, όπως η αποβολή αίματος από το ορθό, έχουν συνδεθεί με καλύτερα ποσοστά επιβίωσης, ενόσω άλλα, όπως η εντερική απόφραξη ή η διάτρηση, με πτωχότερη πρόγνωση.

Η εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου επηρεάζει πιθανόν την έκβαση της νόσου. Τριετή διαστήματα επιβίωσης ελεύθερα νόσου έχουν καταγραφεί σε ποσοστά 2% - 14% υψηλότερα μετά από εγχειρήσεις για καρκίνους στο αριστερό κόλο σε σύγκριση με τις αντίστοιχες για το δεξί.

Η ηλικία διάγνωσης του ΚΠΕ έχει κάποια επίπτωση στην πρόγνωση αυτού. Η εμφάνιση του καρκίνου σε άτομα κάτω των 30 ετών καθώς και σε παιδιατρικούς ασθενείς συνδυάζεται με ιδιαιτέρως πτωχή πρόγνωση. Πάραυτα, αν και ο ΚΠΕ κάνει την εμφάνισή του σε νεαρότερες ηλικίες σε ασθενείς με HNPCC, η πρόγνωση του είναι σαφώς καλύτερη σε αυτούς σε σχέση με εκείνους που πάσχουν από καρκίνο με μικροδορυφορική αστάθεια.

Τα προεγχειρητικά επίπεδα του καρκινοεμβρικού αντιγόνου (CEA) έχουν σχέση με την έκβαση του ΚΠΕ. Συγκεκριμένα, έχουν προγνωστική αξία μόνον σε ασθενείς σταδίου C κατά Dukes, οι οποίοι φέρουν 4 ή περισσότερους διηθημένους λεμφαδένες, και όχι σε ασθενείς σταδίου A ή B κατά Dukes ή C με διήθηση λιγότερων από 4 λεμφαδένων.

Το ¼ περίπου των ασθενών με ΚΠΕ έχουν κλινικά ευρήματα αιματογενούς διασποράς κατά την περίοδο της αρχικής διάγνωσης της νόσου. Η συνήθης θέση απομακρυσμένης μετάστασης του ΚΠΕ είναι το ήπαρ και η παρουσία της συνεπάγεται πτωχή πρόγνωση σε οιαδήποτε φάση της κλινικής πορείας της κακοήθειας. Ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει την επιβίωση ασθενών με ηπατικές μεταστάσεις είναι η έκταση της κατάληψης του ήπατος από τον όγκο (13).

β) Μορφολογία – Ιστολογία του καρκίνου

Η πρόγνωση του ΚΠΕ σχετίζεται στενά και κατά κύριο λόγο με το στάδιο της νόσου τη στιγμή της διάγνωσης. Η σταδιοποίηση του καρκίνου σχετίζεται με τη σειρά της με το βάθος ενδοτοιχωματικής διήθησης και την παρουσία ή απουσία διηθημένων λεμφαδένων ή απομακρυσμένων μεταστάσεων. Το σύστημα TNM συνεχίζει να αποτελεί το gold standard για την αξιολόγηση της διαδικασίας. Στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην παρατήρηση ότι για πλείστους καρκίνους το μέγεθος του όγκου σχετίζεται με την τοπική και την απομακρυσμένη επέκταση αυτού και ως εκ τούτου με την πρόγνωση του. Από πολυάριθμες μελέτες, πάντως, φαίνεται ότι ο ΚΠΕ αποτελεί εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα, αφού ασθενείς με εξωφυτικούς ή πολυποειδείς καρκίνους έχουν καλύτερη πρόγνωση από εκείνους με ελκωτικού ή διηθητικού τύπου όγκους (13,57). Αρχικά, το σύστημα TNM είχε αναπτυχθεί για την πρόβλεψη της πρόγνωσης και μόνο. Στην πορεία, όμως, η χρήση του επεκτάθηκε και στην αρωγή επιλογής της

καταλληλότερης θεραπείας καθώς και των πλέον κατάλληλων ασθενών για κλινικές μελέτες (57).

Ο βαθμός νεοπλασματικής διείσδυσης σχετίζεται με τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων καθώς και με την πιθανότητα τοπικής υποτροπής μετά από χειρουργική εξαίρεση (13).

Στην τελευταία αναθεωρημένη έκδοσή του, το στάδιο II υποδιαιρείται στα στάδια IIA(T3 N0 M0) και IIB(T4 N0 M0). Οι ασθενείς σταδίου IIB έχουν χειρότερη πρόγνωση από εκείνους σε στάδιο IIIA, παρότι οι τελευταίοι λαμβάνουν συχνά συμπληρωματική θεραπεία.

Εκτός από το σύστημα TNM, άλλα νεοπλασματικά χαρακτηριστικά που έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικά για την πρόγνωση είναι η φλεβική και λεμφαγγειακή διήθηση, που συνιστούν κρίσιμα βήματα για το σχηματισμό μικρομεταστάσεων και τη μακροσκοπική, τελικά, ανάπτυξη του όγκου σε δευτερεύουσα θέση (57). Στις περισσότερες μελέτες, η φλεβική διήθηση σχετίζεται με τοπική υποτροπή μετά εκτομή, σπλαγχνικές μεταστάσεις και μειωμένη επιβίωση ενώ φαίνεται ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για νεοπλασίες που περιορίζονται στο εντερικό τοίχωμα. Η διήθηση λεμφαγγείων από την άλλη, παρότι σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση, δεν είναι σαφές εάν είναι ανεξάρτητη από το βάθος της νεοπλασματικής διήθησης και τη μετάσταση σε περιφερικούς λεμφαδένες. Άλλος παράγοντας που έχει σχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα τοπικής υποτροπής και ελαττωμένη επιβίωση είναι η περινευρική διήθηση, αν και η στοιχειοθέτησή της είναι ελλιπής (13).

Έτερο ιστολογικό χαρακτηριστικό με προγνωστική αξία είναι ο βαθμός (grade) της κακοήθειας που αξιολογείται με βάση την εκατοστιαία αναλογία παρουσίας αδένων στον όγκο (57). Τα περισσότερα συστήματα ταξινόμησης κατατάσσουν τους ΚΠΕ σε τρεις έως τέσσερις βαθμούς:

Grade 1: Καλώς διαφοροποιημένοι

Grade 2: Μετρίως διαφοροποιημένοι

Grade 3: Πτωχά διαφοροποιημένοι

Grade 4: Αδιαφοροποίητοι

Στις περισσότερες μελέτες στοιχειοθέτησης της προγνωστικής δυναμικής της σταδιοποίησης των όγκων, παρουσιάζονται δύο επιμέρους ταξινομήσεις:

- χαμηλού βαθμού κακοήθειας: με καλή και μέτρια διαφοροποίηση
- υψηλού βαθμού κακοήθειας: με πτωχή διαφοροποίηση και αδιαφοροποίητοι (59).

Η πτωχή διαφοροποίηση σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με την υψηλόβαθμη (13).

Όσον αφορά τον ιστολογικό τύπο, οι περισσότεροι δεν έχουν καμία προγνωστική σημασία. Αξιοσημείωτες εξαιρέσεις αποτελούν οι βλεννώδεις και οι σκίρροι καρκίνοι που παρουσιάζουν επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά και χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη επιβίωση σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα, ενώ οι όγκοι <<δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου>> αναφέρονται ως εξαιρετικά διηθητικοί και με κακή πρόγνωση. Το ίδιο ισχύει και για τους μικροκυτταρικούς καρκίνους ενώ τα μυελοειδή καρκινώματα έχουν ευνοϊκότερη πρόγνωση (13,59).

Ο καθορισμός των ορίων (border configuration) των ορθοκολικών καρκινωμάτων είναι προγνωστικά σημαντικός με τρόπο άσχετο από το στάδιο της νόσου ενώ δίδει τη δυνατότητα πρόβλεψης ηπατικών μεταστάσεων. Πιο ειδικά, ένα ανώμαλο, διηθητικό μοντέλο ανάπτυξης, σε αντίθεση με ένα ομαλώς επεκτεινόμενο όριο, έχει φανεί ότι αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα πρόγνωσης σε διάφορες αναλύσεις πολλαπλών μεταβλητών.

Το budding του όγκου περιγράφεται ως η μετάβαση από αδενικές δομές σε απλά αδιαφοροποίητα κύτταρα ή αθροίσεις έως 4 κυττάρων στο διηθητικό όριο των ΚΠΕ. Αναφέρεται, επίσης και ως <<εστιακή αποδιαφοροποίηση>>. Τα νεοπλασματικά buds έχουν ιδιότητες κακοήθων προγονικών (stem) κυττάρων με δυνατότητες επαναδιαφοροποίησης τόσο σε τοπικό επίπεδο όσο και σε θέσεις μεταστάσεων. Με βάση διάφορες μελέτες, το νεοπλασματικό budding είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την τοπική επέκταση, τη λεμφαδενική και απομακρυσμένη μετάσταση, την υποτροπή του όγκου και την πτωχή επιβίωση μετά από θεραπευτική επέμβαση ενώ κάποιες υποστηρίζουν ότι έχει μεγαλύτερη προγνωστική αξία από τη συνολική σταδιοποίηση (57,59).

Ποσοτικοποιημένα στοιχεία που αφορούν το νεοπλασματικό budding έχουν σχετισθεί με μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου, χαρακτηριστικό που περιγράφεται στο 30% των καρκίνων. Η απουσία του νεοπλασματικού budding έχει συσχετισθεί με την παρουσία λεμφοκυττάρων εντός και πέριξ του όγκου, στοιχείο που υποδεικνύει την ύπαρξη ανοσολογικής αντίδρασης η οποία είναι υπεύθυνη για την καταστροφή των buds και άρα την καλύτερη πρόγνωση (57).

Ανοσολογική απόκριση του ξενιστή στον όγκο: η σημασία των ενδοογκικών λεμφοκυττάρων καθώς και των σχετιζόμενων με τον όγκο ανοσολογικών αποκρίσεων καθίσταται όλο και περισσότερο εμφανής. Η λεμφοκυτταρική διήθηση του όγκου και των περι τον όγκο ιστών είναι ενδεικτική της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή στη διηθητική κακοήθεια και φαίνεται – με βάση διάφορες μελέτες – να αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα. Αποτελέσματα αρκετών προσφάτων μελετών τονίζουν τη σημαντική προγνωστική αξία του τύπου, της πυκνότητας και της εντόπισης (στο διηθητικό όριο ή στο κέντρο του όγκου) των ανοσοκυττάρων και την επίδρασή τους στην πρόγνωση, ανεξάρτητα από την TNM σταδιοποίηση. Για παράδειγμα, οι Baker et al. (2007), έδειξαν πρόσφατα σε περισσότερους από 1000 ΚΠΕ ότι ο μεγάλος αριθμός ενδοεπιθηλιακών ενδοογκικών λεμφοκυττάρων συνδέεται στενά με πρώιμα στάδια καρκινικής ανάπτυξης και με σημαντικά βελτιωμένη έκβαση ασθενών με MSS ΚΠΕ (13, 57, 59).

9B) Μοριακοί δείκτες

α) Μικροδορυφορική αστάθεια

Περί το 75% - 85% των ΚΠΕ προκύπτουν μέσω μηχανισμού χρωμοσωμικής αστάθειας (μικροδορυφορική σταθερότητα, MSS) που χαρακτηρίζεται από ανευπλοειδία, απώλειες αλληλίων, πολλαπλασιασμούς, μεταθέσεις και μεταλλάξεις των γονιδίων APC, KRAS και p53. Η πρόγνωση των ασθενών με MSS ΚΠΕ εξαρτάται από το βαθμό και το στάδιο (grade) του καρκίνου, παρότι όγκοι με ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά έχουν επιδείξει ετερογένεια ως προς την κλινική τους έκβαση. Το υπόλοιπο 15 – 20% των ΚΠΕ εμφανίζει μικροδορυφορική αστάθεια σε μεγάλη συχνότητα (MSI-H) η οποία

χαρακτηρίζεται από αδρανοποίηση των γονιδίων επιδιόρθωσης (MMR). Σποραδικές MSI-H περιπτώσεις έχουν προκύψει – όπως φαίνεται – από προαγωγό υπερμεθυλίωση και υποχρέωση σε σιγή του hMLH1 γονιδίου. Ο κληρονομικός μη πολυποδιασικός ΚΠΕ (HNPCC) αποτελεί το 5% - 15% των ΚΠΕ και εμφανίζει MSI-H ένεκα germline μεταλλάξεων σε κάποιο από τα DNA MMR γονίδια. Οι όγκοι με MSI-H έχουν συχνά κεντρικότερη εντόπιση, πτωχότερη διαφοροποίηση, βλεννώδη ιστολογικό τύπο, σημαντική λεμφοκυτταρική διήθηση και έχουν συνδεθεί με μεταλλάξεις TGFBRII και BRAF. Πρόσφατη μετα-ανάλυση αναδρομικών μελετών από τους Porat et al. (2005) στην οποία συμπεριλήφθησαν περισσότεροι από 7000 ασθενείς, έδειξε ότι οι καρκίνοι με MSI εμφάνιζαν σημαντικά βελτιωμένο συνολικό χρόνο επιβίωσης από εκείνους με MSS. Όμως, αν και οι MSS ΚΠΕ ωφελούνται σε επίπεδο επιβίωσης από τη συμπληρωματική 5-FU θεραπεία, οι MSI όγκοι είναι ανθεκτικότεροι σε αυτή.

β) Απώλεια ετεροζυγωτίας των χρωμοσωμάτων 18q(DCC,DPC4) και 17(p53)

Χρωμοσωμική έλλειψη στο 18q έχει αναφερθεί στο 70% περίπου των περιπτώσεων με ΚΠΕ. Το γονίδιο DCC, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18q21, κατέχει ρόλο κλειδί στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο. Ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο σταδίου II ή III, εμφανίζουν σημαντικά πτωχότερη πρόγνωση με απώλεια του 18q.

Μεταλλάξεις του p53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου παρατηρούνται κατά προσέγγιση στο 50% των ΚΠΕ. Παρότι όμως, η σημασία της μετάλλαξης του p53 γονιδίου στην κλινική έκβαση του ΚΠΕ αποτελεί αντικείμενο 20ετούς μελέτης, οριστικά συμπεράσματα δεν έχουν εξαχθεί ακόμη.

γ) Καθορισμός του προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Ο καθορισμός του γονιδιακού προφίλ αναμένεται να βοηθήσει στην αναγνώριση των ασθενών με επιθετικότερους και ανθεκτικούς στη θεραπεία όγκους. Με τη χρήση μιας σειράς cDNA με περισσότερα από 30000 διαφορετικά γονιδιακά αντίγραφα, οι Eschrich et al. (2005) αναγνώρισαν 43 πυρηνικά γονίδια ικανά να προβλέψουν συνολική επιβίωση 36 μηνών με ακρίβεια 90% και με τη χρήση 78 δειγμάτων ασθενών, αποτέλεσμα που επικυρώθηκε με τη χρήση ενός ανεξαρτήτου σετ ασθενών. Η μοριακή σταδιοποίηση ήταν πλέον ακριβής στον καθορισμό της πρόγνωσης σε σύγκριση με τη σταδιοποίηση κατά Dukes. Η μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης έχει επίσης εφαρμοσθεί με επιτυχία στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης του καρκίνου ασθενών με καρκίνο του ορθού σε προεγχειρητική χημειο-ακτινοθεραπεία. Η ανωτέρω διαδικασία μπορεί να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη νέα κατεύθυνση στην εξατομίκευση θεραπευτικών πρωτοκόλλων (57).

10. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Ο όρος χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση φυσικών ή συνθετικών παραγόντων με στόχο την αναστροφή, καταστολή ή πρόληψη ανάπτυξης ή υποτροπής του καρκίνου και συνιστά θεμέλια λίθο της <<πρωτογενούς πρόληψης>>.

Ως προς τον καρκίνο του παχέος εντέρου, τα περισσότερα στοιχεία προέρχονται από μελέτες σε πειραματόζωα και από επιδημιολογικές ή τυχαιοποιημένες μελέτες σε ανθρώπους (13).

Ο ρόλος της δίαιτας καθώς και του τρόπου ζωής (φυσική δραστηριότητα, σωματικό βάρος, συνήθειες πχ κάπνισμα) έχει ήδη συζητηθεί σε προηγούμενη ενότητα. Παράγοντες, η χρήση των οποίων έχει σχετισθεί με πιθανή προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι οι ακόλουθοι:

α) Ασβέστιο και Βιταμίνη D

Επιδημιολογικά, κλινικά αλλά και εργαστηριακά δεδομένα έχουν συσχετίσει την πρόσληψη ασβεστίου με πρόληψη της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο. Αρχικά, η συγκεκριμένη συσχέτιση προέκυψε από επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες είχαν καταγράψει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ πρόσληψης ασβεστίου - βιταμίνης D και ορθοκολικού καρκίνου.

Περαιτέρω θετικά μηνύματα περί της χρησιμότητας μιας τέτοιας πρόσληψης, προήλθε από πολυάριθμες μελέτες σε πειραματόζωα: ανώμαλος κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρατηρείται τόσο σε νεοπλασματικές όσο και σε προ-νεοπλασματικές εντερικές αλλοιώσεις. Η αύξηση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων που διεγείρεται από ενδορθικός εγγεόμενα ελεύθερα λιπαρά οξέα ή από προσθήκη χολικών οξέων στη δίαιτα μπορεί να βελτιωθεί με τη χορήγηση ασβεστίου από το στόμα σε πειραματόζωα.

Έχει προταθεί ότι το ασβέστιο της δίαιτας προσδένεται στα ιονισμένα λιπαρά οξέα καθώς και στα χολικά οξέα του εντερικού σωλήνα, μετατρέποντάς τα τοιουτοτρόπως σε αδιάλυτες ενώσεις ασβεστίου (σάπωνες) που δεν δύνανται πλέον να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό του εντερικού επιθηλίου. Επιπρόσθετα, το ασβέστιο αυξάνει την έκκριση φωσφορικών και χολικών αλάτων στα κόπρανα, τροποποιώντας με αυτό τον τρόπο τις σχετικές συγκεντρώσεις των χολικών οξέων στη χολή ενώ παράλληλα αναστέλλει την επίδραση κυτταροτοξικών επιφανειοδραστικών παραγόντων του εντερικού αυλού στο επιθήλιο. Άλλοι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης του ασβεστίου είναι η άμεση ελάττωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η διέγερση της διαφοροποίησης και η επαγωγή απόπτωσης στον εντερικό βλεννογόνο (13,19).

Όλες αυτές οι θετικές επιδράσεις του ασβεστίου δεν έχουν καταγραφεί στο σύνολο των μελετών. Μελέτες επίδρασης του ασβεστίου στον ορθικό βλεννογόνο δεν έχουν καταδείξει πάντοτε ελάττωση του επιθηλιακού πολλαπλασιασμού ενώ σε κάποιες άλλες η χορήγηση συμπληρωμάτων ασβεστίου ομαλοποίησε την κατανομή των πολλαπλασιασθέντων κυττάρων στις εντερικές κρύπτες χωρίς καμία επίδραση όμως στο ρυθμό του πολλαπλασιασμού (13).

Μελέτες κοόρτης αλλά και ελεγχόμενες μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα στοιχεία. Τρεις από αυτές δεν έδειξαν φθίνουσα επίπτωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από τη χορήγηση ασβεστίου, αν και οι πληθυσμοί ασθενών περιελάμβαναν άτομα υψηλού κινδύνου για ορθοκολικό καρκίνο, με αδενώματα ή ήδη χειρουργηθέντα καρκίνο. Σε αυτές τις μελέτες, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι το ασβέστιο πιθανόν να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι του σχηματισμού νέων αδενωμάτων (18).

Όσον αφορά τη βιταμίνη D, τόσο οι μεταβολίτες όσο και τα ανάλογά της πρόσφατα έχει φανεί ότι παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση αρκετών σημαντικών διαδικασιών στο κύτταρο, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση (13).

Σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ασβέστιο και η βιταμίνη D δρουν πιθανόν από κοινού παρά μεμονωμένα, στην ελάττωση του κινδύνου ανάπτυξης

αδενωμάτων στο παχύ έντερο (18). Φαίνεται, επίσης, ότι, η βιταμίνη E σε δόσεις 1000 – 2000mg ανά ημέρα, βελτιώνει τη συνολική κατάσταση του οργανισμού και πιθανά μειώνει τον κίνδυνο ΚΠΕ (19).

β) Φυλλικό οξύ

Το φυλλικό οξύ και οι μεταβολίτες του έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη σύνθεση και τη μεθυλίωση του DNA (13).

Η παρατήρηση ότι η χορήγηση φυλλικού οξέος σχετίστηκε με σημαντική ελάττωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα οδήγησε τους ερευνητές σε αναψηλάφηση του ρόλου του στην πρόληψη αυτού του τύπου καρκίνου (18).

Στοιχεία από in vitro και in vivo μελέτες στηρίζουν ισχυρά την προστατευτική δράση του φυλλικού οξέος στον ορθοκολικό καρκίνο ενώ η διενέργεια τυχαιοποιημένων μελετών έχει αναδείξει και ελάττωση του κινδύνου ανάπτυξης αδενωμάτων. Η χορήγηση φυλλικού οξέος απέτρεψε ρήξεις στις αλύσους του DNA αρουραίων, σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου p53, προτείνοντας ένα πιθανό μηχανισμό καταστολής της καρκινογένεσης από το συγκεκριμένο συστατικό (60). Σχετικά πρόσφατη μελέτη, αναφέρει αξιοσημείωτη και στατιστικά σημαντική ελάττωση στον καρκίνο του παχέος εντέρου μετά από λήψη φυλλικού οξέος για περισσότερα από 15 έτη. Σε όλες σχεδόν τις μελέτες, πάντως, η πρόσληψη αλκοόλ έχει συσχετισθεί με αύξηση του κινδύνου για εντερικό καρκίνο και αυτή η συσχέτιση φαίνεται πολύ πιο ισχυρή εκείνης με το φυλλικό οξύ.

γ) Σελήνιο

Πολυάριθμες μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι το σελήνιο έχει αντικαρκινικές ιδιότητες. Μελέτη που αφορούσε τη χορήγηση του συγκεκριμένου στοιχείου σε ασθενείς με καρκίνο του δέρματος ανέδειξε μέχρι και 50% μείωση του κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου, δυστυχώς με πολύ ισχνή στατιστική διαφορά. Η μετέπειτα follow up ανάλυση των δεδομένων, πάντως, κατέστησε φανερή τη θετική συσχέτιση της αυξημένης λήψης σεληνίου με τον μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης αδενωμάτων. Μελέτες παρατήρησης έχουν επίσης δώσει παρεμφερή αποτελέσματα (23).

δ) Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στον κίνδυνο ανάπτυξης χρονίων νόσων, του καρκίνου μηδέ εξαιρουμένου. Το κατά πόσο αυτός ο μηχανισμός είναι σημαντικός για τον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν είναι απόλυτα σαφές.

Μελέτες χρήσης αντιοξειδωτικών συστατικών σε ανθρώπους, και κυρίως καροτενοειδών και βιταμινών A, C και E, έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα και ως εκ τούτου δεν συστήνεται η χορήγησή τους για την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου σε άτομα μέσου κινδύνου (19,23,61).

ε) Προβιοτικά

Τα προβιοτικά αντιπροσωπεύουν ζωντανούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι χορηγούμενοι σε επαρκείς ποσότητες αποδίδουν σημαντικό όφελος στην υγεία του ξενιστή. Πέραν του ευρέως γνωστού ρόλου τους στη διαμόρφωση ενός υγιούς εντέρου, φαίνεται ότι έχουν επιπλέον πλεονεκτήματα, όπως η βελτίωση της δυσανεξίας στη λακτόζη, η ενδυνάμωση της χυμικής ανοσίας, η ελάττωση της χοληστερόλης του αίματος κ.α.

Η πιθανή χρησιμότητά τους στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου έχει κερδίσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των θετικών in vivo αποτελεσμάτων και μοριακών μελετών. Διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί, όπως αντικαρκινογενετική δράση, αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες, τροποποίηση των διαδικασιών διαφοροποίησης σε καρκινικά κύτταρα, παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου και μεταβολή της έκφρασης γονιδίων των όγκων. Παρά τα θετικά ευρήματα, όμως, άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει μη σημαντικές καρκινοπροστατευτικές ιδιότητες και ως εκ τούτου απαιτείται περαιτέρω έλεγχος προς επίτευξη πλέον αξιόπιστων συμπερασμάτων (16).

στ) Ασπιρίνη – Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ)

Με βάση στοιχεία από ένα μεγάλο αριθμό επιδημιολογικών μελετών, η χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων ελαττώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης φαινομενικά όλων σχεδόν των τύπων καρκίνου. Μια προσεκτική επισκόπηση αυτών των μελετών δείχνει ότι η λήψη ΜΣΑΦ - και συγκεκριμένα ασπιρίνης ή ιβουπροφαίνης - συνδέεται με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης 7 σε σύνολο 10 υπό διερεύνηση τύπων νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένων των 4 βασικών, δηλαδή του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα και του προστάτη. Με καθημερινή λήψη 325 mg ασπιρίνης ή 200 mg ιβουπροφαίνης επετεύχθη ελάττωση του κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου κατά 63%, για καρκίνο του μαστού κατά 39%, για καρκίνο του πνεύμονα κατά 36% και τέλος για καρκίνο του προστάτη κατά 39%. Σημαντικές ανάλογες μειώσεις έχουν ανακοινωθεί και για τους καρκίνους του οισοφάγου (73%), του στομάχου (62%) και των ωοθηκών (47%). Η επίδραση των ΜΣΑΦ ήταν εμφανής ύστερα από 5 ή περισσότερα έτη συνεχούς πρόσληψης των φαρμάκων και καθίστατο ισχυρότερη με την επιμήκυνση του χρονικού διαστήματος χορήγησης αυτών (62).

Το ενδιαφέρον σχετικά με τη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων στον καρκίνο του παχέος εντέρου προέκυψε κατόπιν της παρατήρησης ότι άτομα που ελάμβαναν σε χρόνια βάση μεγάλες ποσότητες ασπιρίνης εμφάνιζαν ελαττωμένη θνησιμότητα από το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (23).

Στοιχεία σχετικά με την επίδραση των ΜΣΑΦ στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου προέκυψαν από περισσότερες από 200 τυχαιοποιημένες, placebo ελεγχόμενες μελέτες σε πειραματόζωα, στις οποίες η συστηματική χορήγηση ποικίλλων ΜΣΑΦ είχε ως αποτέλεσμα μικρότερο αριθμό καρκίνων ανά ζώο και μικρότερο αριθμό ζώων με καρκίνο, καταδεικνύοντας με σαφήνεια την προστατευτικό ρόλο των φαρμάκων αυτών στην εντερική καρκινογενετική διαδικασία στους αρουραίους.

Οι Kune et al. (1988), ανακοίνωσαν την πρώτη κλινικά ελεγχόμενη μελέτη πληθυσμού που έδειξε σχετικό κίνδυνο 0,53% για καρκίνο του παχέος εντέρου μεταξύ χρηστών και μη χρηστών ασπιρίνης. Έκτοτε, πολλαπλές επιδημιολογικές μελέτες καθώς και μελέτες κοόρτης έχουν δείξει ότι τα ΜΣΑΦ προλαμβάνουν την ανάπτυξη αδενωμάτων, ελαττώνουν την επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου και επιφέρουν 40% έως και 50% ελάττωση στην σχετιζόμενη με αυτό τον καρκινικό τύπο θνησιμότητα, σε άτομα που λαμβάνουν ασπιρίνη ή ΜΣΑΦ σε σταθερή βάση σε σύγκριση με εκείνους που δεν αναφέρουν τέτοιου τύπου λήψη. Η προστατευτική επίδρασή τους είναι δόσοεξαρτώμενη, και το κυριότερο, άμεσα σχετιζόμενη με τη διάρκεια της έκθεσης (63).

Ο μηχανισμός καρκινοπροστασίας είναι άγνωστος αλλά πιθανόν να έχει σχέση με τη μεταβολή στη σύνθεση των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (εικοσανοειδή) που περιλαμβάνει τις προσταγλανδίνες, τις θρομβοξάνες, τα λευκοτριένια και τα υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα. Οι ουσίες αυτές ρυθμίζουν ένα σημαντικό αριθμό μονοπατιών μεταγωγής του σήματος που πιθανόν επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Η κυκλοοξυγενάση (COX) οξειδώνει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνη G2, μειώνει την προσταγλανδίνη G2 σε προσταγλανδίνη H2 και εν γένει αποτελεί το ένζυμο-κλειδί για την παραγωγή προσταγλανδινών και εικοσανοειδών. Το ένζυμο ανευρίσκεται σε δύο ισομορφές: COX-1 και COX-2 (13). Η COX-2 αποτελεί ένα επαγωγίσιμο ένζυμο, με αυξημένα επίπεδα σε περιοχές φλεγμονής και νεοπλασίας. Η COX-2 ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο 40% - 50% των αδενωμάτων ενώ η έκφρασή της είναι αξιοσημείωτα αυξημένη στο 85% -95% των καρκίνων του παχέος εντέρου, όπως και σε πειραματικά μοντέλα (13,63).

Η αναστολή της COX-2 εμποδίζει την ανάπτυξη καρκίνου κατά τη διάρκεια τόσο της έναρξης όσο και της προαγωγής/εξέλιξης της καρκινογενετικής διαδικασίας. Παρότι πάντως θεωρείται ότι τα ΜΣΑΦ ελαττώνουν την καρκινογένεση μέσω αναστολής του επαγόμενου από τις προσταγλανδίνες πολλαπλασιασμού, επιπλέον στοιχεία δείχνουν ότι σημαντικό μέρος της δράσης τους προκύπτει από επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης. Η αναστολή της COX-2 οδηγεί σε αύξηση της απόπτωσης. Άλλος πιθανός μηχανισμός με τον οποίο τα ΜΣΑΦ επάγουν την απόπτωση είναι μέσω αύξησης του αραχιδονικού οξέος λόγω αναστολής της κυκλοοξυγενάσης, η οποία διεγείρει τη μετατροπή της σφινγγομυελίνης σε ceramide, έναν μεσολαβητή δηλαδή της απόπτωσης. Τα ΜΣΑΦ επίσης μπορεί ακόμη να αναστέλλουν την ενεργοποίηση γονιδίων από τον υποδοχέα PPARδ, παραβιάζοντας την ικανότητα αυτού του υποδοχέα να συνδέεται με το DNA. Η αναστολή της λειτουργίας του PPARδ επαυξάνει την ικανότητα των ΜΣΑΦ να επάγουν απόπτωση στα εντερικά καρκινικά κύτταρα. Ο PPARδ ενεργοποιεί μια σειρά γονιδίων στα οποία συμπεριλαμβάνονται εκείνα που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες, όπως τα εικοσανοειδή. Η αναστολή, λοιπόν, της COX-2 θα μπορούσε κάλλιστα να εμποδίσει την παραγωγή τέτοιων παραγόντων και άρα την ενεργοποίηση του PPARδ.

Κάποιοι άλλοι μηχανισμοί παρεμπόδισης της εντερικής καρκινογένεσης μέσω αναστολής της COX-2 περιλαμβάνουν μεταβολές της κυτταρικής προσκόλλησης σε εξωκυττάρια πρωτεΐνες, αναστολή της καρκινικής αγγειογένεσης και ελάττωση της ενεργοποίησης καρκινογόνων (13).

Δυστυχώς, όμως, η τοξικότητα από το καρδιαγγειακό σύστημα των COX-2 αναστολέων, στις ιδανικές, για αποτελεσματική χημειοπροφύλαξη, δόσεις, τους καθιστούν ακατάλληλους για τέτοιου είδους χρήση (19).

ζ) Αναστολείς της HMG-CoA ρεδουκτάσης

Οι στατίνες, αποτελούν μια κατηγορία φαρμακευτικών ουσιών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και επάγουν την απόπτωση. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση λοβαστατίνης σε χαμηλή δόση αυξάνει την εκ σουλινδάκης επαγομένη απόπτωση στα εντερικά καρκινικά κύτταρα και ενισχύει τις χημειοπροφυλακτικές επιδράσεις της σουλινδάκης.

Σε πειραματόζωα, οι στατίνες έχουν προκαλέσει ελάττωση των περιπτώσεων καρκίνου στο παχύ έντερο αλλά και της ανάπτυξης πολυπόδων σε περιστατικά με FAP. Στον άνθρωπο, παρότι έχουν προκύψει ενθαρρυντικά αποτελέσματα ελάττωσης της επίπτωσης ορθοκολικού καρκίνου από ορισμένες μελέτες, πρόσφατες δημοσιεύσεις αλλά και επιδημιολογικά δεδομένα δεν δείχνουν ανάλογη ελάττωση του καρκινικού κινδύνου σε χρήστες στατινών ούτε βεβαίως και αύξηση αυτού. Ως εκ τούτου, τα τρέχοντα επιδημιολογικά στοιχεία είναι εξαιρετικά αδύναμα για να στηρίξουν τη χρήση στατινών

για χημειοπροφύλαξη στον καρκίνο του παχέος εντέρου, μέχρι περαιτέρω μελέτης και διεξαγωγής ασφαλέστερων συμπερασμάτων (63).

η) Ορμονική θεραπεία υποκατάστασης

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας εικοσαετίας, η θνησιμότητα από καρκίνο του παχέος εντέρου έχει σημειώσει ελάχιστη μείωση στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες. Στις περισσότερες μελέτες αναφέρεται κατά προσέγγιση ελάττωση 30% - 40% του κινδύνου ανάπτυξης ΚΠΕ σε γυναίκες με μετεμμηνοπαυσιακή χρήση ορμονών. Η επίδραση μιας τέτοιας χορήγησης ήταν ισχυρότερη στις γυναίκες εκείνες που ελάμβαναν συνεχή θεραπεία υποκατάστασης για περισσότερα από 11 χρόνια. Ο υποκείμενος μηχανισμός είναι άγνωστος, αν και πιθανολογούνται ως πιθανοί η μείωση της παραγωγής δευτερογενών χολικών οξέων και του παράγοντα ανάπτυξης που μοιάζει στην ινσουλίνη τύπου 1 από τα οιστρογόνα ή η απευθείας δράση αυτών στα επιθηλιακά κύτταρα ή τέλος συνδυασμός κάποιων εξ αυτών των μηχανισμών.

Δυστυχώς, πάντως, η αυξημένη εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών από το καρδιαγγειακό σύστημα αλλά και καρκίνου του μαστού έχει καταστήσει τη θεραπεία υποκατάστασης ως μη συνιστώμενη για χημειοπροφυλακτικούς λόγους.

Άλλοι παράγοντες όπως το ουρσοδεοξυχολικό οξύ, η διφλουορομεθυλορνιθίνη, τα NO-MΣΑΦ, η μεσαλαζίνη ή η κουρκουμίνη έχουν επίσης μελετηθεί ως προς τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο, με αντιφατικά αποτελέσματα που χρήζουν ευρύτερης διερεύνησης (19,63).

θ) Φυσική δραστηριότητα

Η φυσική δραστηριότητα, ως παράγων κατανάλωσης και ισορροπίας της ενέργειας στον οργανισμό, μπορεί από μόνη της να συσχετισθεί με μειωμένο κίνδυνο ΚΠΕ. Η συσχέτιση ανάμεσα σε υψηλότερα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας και μειωμένου κινδύνου για ΚΠΕ είναι από τις πλέον σταθερά παρατηρηθείσες και παρότι ο κίνδυνος αυτός μειώνεται περισσότερο με την αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, φαίνεται ότι και μέτρια δραστηριότητα (πχ ζωηρό βάδισμα για 3-4 ώρες/ εβδομάδα) σχετίζεται με σημαντικό όφελος.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η φυσική δραστηριότητα ελαττώνει τον κίνδυνο ΚΠΕ δεν είναι γνωστοί, αλλά θα μπορούσαν να συμπεριλαμβάνουν μειώσεις των επιπέδων ινσουλίνης και της συστηματικής φλεγμονής.

Εν περιλήψει, μια φυσική δραστηριότητα ρουτίνας, σε συνδυασμό με τη διατήρηση φυσιολογικού σωματικού βάρους συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ(19).

11. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

11Α) Συμπτώματα

Τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου αναπτύσσονται βραδέως και ως εκ τούτου μπορεί να είναι παρόντα τουλάχιστον 5 χρόνια πριν δώσουν συμπτωματολογία.

Τοιουτοτρόπως, τα συμπτώματα κάνουν συχνά την εμφάνισή τους σε προχωρημένα στάδια, όταν η πρόγνωση είναι πτωχή, και σπανίως και με αμβληχρό τρόπο κατά την έναρξη της νόσου (13,40).

Τα συχνότερα συμπτώματα είναι το κοιλιακό άλγος, η αλλαγή των συνηθειών του εντέρου, η αποβολή αίματος από το ορθό είτε ως αιματοχεσία ή ως μέλαινα κένωση, η αδυναμία, η καταβολή και η ακούσια απώλεια βάρους. Αν και η νόσος εκδηλώνεται κατά το πλείστον με διάρροια ή δυσκοιλιότητα, η προσφάτου ενάρξεως μεταβολή των συνηθειών του εντέρου αποτελεί το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμά της. Λιγότερο συχνά συμπτώματα είναι η ναυτία και ο έμετος, η ανορεξία και η κοιλιακή διάταση. Η συμπτωματολογία εξαρτάται από την εντόπιση του καρκίνου, από το μέγεθός του καθώς και από την ύπαρξη μεταστάσεων. Οι καρκίνοι με εντόπιση στο δεξί κόλο αποκτούν συνήθως αυξημένες διαστάσεις προτού προκαλέσουν συμπτώματα σε σύγκριση με εκείνους που εντοπίζονται στο αριστερό κόλο και στο ορθό, διότι το αριστερό ήμισυ του παχέος εντέρου έχει μικρότερη διάμετρο και περιέχει καλύτερα σχηματισμένα κόπρανα λόγω επαναρόφησης ύδατος στο εγγύς τμήμα (40).

Τοιουτοτρόπως, οι καρκίνοι του εγγύς κόλου εκδηλώνονται συνήθως με συμπτώματα υπόχρωμης μικροκυτταρικής αναιμίας (αδυναμία, καταβολή, αίσθημα παλμών, δύσπνοια κλπ) – ένεκα λανθάνουσας απώλειας αίματος – και σπανιότερα με εμφανή απώλεια αίματος αναμεμιγμένου με τα κόπρανα (αιματοχεσία). Καθώς, μάλιστα, λαμβάνουν αυξημένες διαστάσεις, δημιουργούν ήπια κοιλιακή δυσφορία ή γίνονται αντιληπτοί ως ψηλαφητές μάζες. Η εμφάνιση αποφρακτικών συμπτωμάτων είναι ασυνήθης, με μόνη εξαίρεση την εντόπιση της νεοπλασίας στην περιοχή της ειλεοτυφλικής βαλβίδας με επακόλουθο την απόφραξη του άπω λεπτού εντέρου. Αντίθετα, οι καρκίνοι του αριστερού ημίσεος του παχέος εντέρου προκαλούν συχνά αποφρακτικά φαινόμενα και εμφανίζονται με κολικοειδή κοιλιακά άλγη – ίδια μεταγευματικά - και μεταβολή των συνηθειών του εντέρου. Συχνότερα παρατηρείται δυσκοιλιότητα, ενώ παραδόξως η μερική απόφραξη μπορεί να εκδηλωθεί και ως διαλείπουσα διάρροια καθώς μικρές ποσότητες κατακρατημένων κοπράνων μετακινούνται περιφερικότερα της βλάβης. Αιματοχεσία παρατηρείται συχνότερα στους όγκους του άπω κόλου με αποβολή ερυθρού αίματος από το ορθό ή επάλειψη της επιφάνειας των κοπράνων από αυτό (13).

Σε προχωρημένα στάδια, ιδιαίτερα σε παρουσία μεταστάσεων, μπορεί να εμφανισθεί καρκινική καχεξία η οποία χαρακτηρίζεται από την συμπτωματική τετράδα της ακούσιας απώλειας βάρους, της ανορεξίας, της μυϊκής αδυναμίας και του αισθήματος κακουχίας (40). Οι καρκίνοι του ορθού, λόγω τοπικής επέκτασης, μπορεί να διηθήσουν την ουροδόχο κύστη, το τοίχωμα της μήτρας ή τα πέριξ νευρικά πλέγματα προκαλώντας περιναϊκό πόνο.

Πολύ συχνά ο καρκίνος του παχέος εντέρου υποδιαγιγνώσκεται και τα συμπτώματά του αποδίδονται σε καλοήθεις καταστάσεις όπως το ευερέθιστο έντερο, η

εκκολπωματική νόσος ή η αιμορροϊδοπάθεια. Οποσδήποτε, η διάγνωση ορθοκολικού καρκινώματος θα πρέπει να θεωρείται πιθανή σε ασθενή - ιδία άνω των 40 ετών - με υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία ή αιματοχεσία (13).

11B) Σημεία

Όπως και στην περίπτωση των συμπτωμάτων, κλινικά σημεία εμφανίζονται σε προχωρημένη νόσο.

Η αναιμία μπορεί να προκαλέσει ωχρότητα, κοιλονυχία, γλωσσίτιδα και χελίτιδα. Η υπολευκωματιναιμία μπορεί να εκδηλωθεί ως περιφερικό οίδημα, ασκίτης ή ύδρωπας ανά σάρκα. Η ακρόαση των εντερικών ήχων μπορεί να δείξει απόφραξη. Σπάνιο, αλλά ενδεικτικό προχωρημένης νόσου εύρημα αποτελεί η ανεύρεση ψηλαφητής μάζας στην κοιλιά. Οι όγκοι του ορθού ψηλαφώνται συχνά με δακτυλική εξέταση. Άλλα σπανιότερα αντικειμενικά ευρήματα αποτελούν η ηπατομεγαλία σε ηπατικές μεταστάσεις, ο ψηλαφητός λεμφαδένας του Virchow ή η απώλεια μυϊκής μάζας σε καχεξία.

11Γ) Εργαστηριακά ευρήματα

Το ήμισυ περίπου των ασθενών με καρκίνο στο παχύ έντερο εμφανίζουν αναιμία. Ως εκ τούτου, η σιδηροπενική αναιμία αγνώστου αιτιολογίας χρήζει πάντοτε περαιτέρω ελέγχου, ιδιαίτερα σε ηλικιωμένα άτομα. Σε προχωρημένη νόσο μπορεί να εμφανισθεί υπολευκωματιναιμία λόγω υποθρεψίας. Ο βιοχημικός έλεγχος του ήπατος είναι συνήθως φυσιολογικός, με εξαίρεση την παρουσία ηπατικών μεταστάσεων.

Τα επίπεδα καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) στο αίμα δεν αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για προληπτικό έλεγχο, λόγω ελαττωμένης ευαισθησίας. Ο προσδιορισμός των επιπέδων του CEA, πάντως, προεγχειρητικά χρησιμεύει για προγνωστικούς λόγους και ως βασική τιμή αναφοράς για σύγκριση κατά τη μετεγχειρητική περίοδο. Μετά την πλήρη εκτομή του καρκίνου τα επίπεδα του δείκτη στο αίμα επανέρχονται σχεδόν πάντοτε σε φυσιολογικά επίπεδα. Η αποτυχία μετεγχειρητικής ομαλοποίησης των επιπέδων του CEA υποδεικνύει ατελή εκτομή, ενώ η σταθερή και προοδευτική αύξηση αυτών μετά την περίοδο ομαλοποίησης καθιστά εξαιρετικά ισχυρή την πιθανότητα υποτροπής (40).

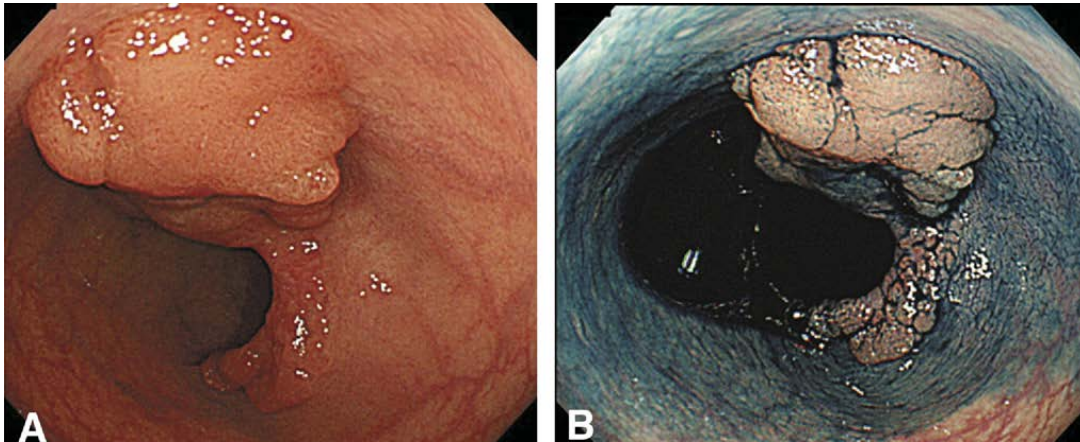
11Δ) Ασυνήθεις κλινικές εκδηλώσεις

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί να εκδηλωθεί ως οξεία εντερική απόφραξη, συνήθως λόγω εξωφυτικής ενδοαυλικής ανάπτυξης, και σπανιότερα ένεκα συστροφής ή εγκλοεασμού. Οι ασθενείς εμφανίζουν κοιλιακό άλγος, ναυτία και έμετο, επίμονη δυσκοιλιότητα, κοιλιακή ευαισθησία, κοιλιακή διάταση και ελαττωμένους εντερικούς ήχους. Σπάνια, ο ΚΠΕ μπορεί να προκαλέσει οξεία διάτρηση του εντερικού τοιχώματος με οξεία γενικευμένη περιτονίτιδα ή προοδευτική, σε ρυθμό εξέλιξης, διάτρηση με σχηματισμό περιτοίχωματικής φλεγμονώδους μάζας ή αποστήματος και τοπικά σημεία περιτοναϊσμού. Μπορεί, επίσης, να οδηγήσει στην ανάπτυξη συριγγίων σε παρακείμενα όργανα, όπως η ουροδόχος κύστη ή το λεπτό έντερο ή και στο στόμαχο (14). Οι κύριοι παράγοντες που λειτουργούν ευοδωτικά για τη διάτρηση είναι η

διάσπαση της βλεννογονικής ακεραιότητας λόγω διατοιχωματικής επέκτασης της κακοήθειας ή ισχαιμίας καθώς και η αυξημένη ενδοαυλική πίεση λόγω εντερικής απόφραξης. Τόσο η διάτρηση όσο και η απόφραξη του παχέος εντέρου αποτελούν δείκτες κακής πρόγνωσης. Ο ΚΠΕ προκαλεί σπανίως ισχαιμικού τύπου κολίτιδα, η οποία οφείλεται σε προστενωτική εντερική διάταση ή κακοήθη διήθηση των αιμοφόρων αγγείων. Περιστασιακά, μπορεί να εμφανισθεί μαζική απώλεια αίματος από το ορθό λόγω εξέλκωσης της καρκινωμάτους μάζας (40). Έχει υπολογισθεί ότι περί το 6% των μεταστατικών αδενοκαρκινωμάτων με άγνωστη πρωτοπαθή εστία προέρχονται από το κόλο (14).

12. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σε υποψία καρκίνου του παχέος εντέρου σε ασθενή, με βάση κλινικά συμπτώματα ή ευρήματα, θα πρέπει να ακολουθήσει άμεσα ο ενδεδειγμένος ενδοσκοπικός και ακτινολογικός έλεγχος για την επιβεβαίωση της διάγνωσης και την εκτίμηση της έκτασης της νόσου. Η κολονοσκόπηση αποτελεί μέθοδο με αυξημένη ακρίβεια σε σύγκριση με το βαριούχο υποκλυσμό διπλής σκιαγραφικής αντίθεσης, ιδιαίτερα όσον αφορά βλάβες μικρότερες του 1cm, πχ αδενώματα. Επιπρόσθετα, οι νεοπλασίες στην περιοχή του ορθοσιγμοειδούς διαγιγνώσκονται δυσχερώς ακτινολογικά, και σε αυτές τις περιπτώσεις η ενδοσκόπηση είναι επιβεβλημένη για την τεκμηρίωση της διάγνωσης (13). Η κολονοσκόπηση έχει υψηλή ειδικότητα για την διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Προσφέρει τη δυνατότητα αφαίρεσης πολυπόδων και λήψης βιοψιών από βλάβες προς ιστοπαθολογική εξέταση κι αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία αφού σε ένα αδενωματώδη πολύποδα μπορεί να συνυπάρχει πρώιμος καρκίνος, ο οποίος όμως δεν δύναται να διακριθεί από τον πέριξ αυτού καλοήγη ιστό μόνο με την ενδοσκόπηση. Για παράδειγμα, ένα θηλώδες αδένωμα μεγέθους 2cm, έχει κατά προσέγγιση 40% πιθανότητα να φιλοξενεί καρκίνο (14). Η ενδοσκόπηση υψηλής αντίθεσης η οποία πραγματοποιείται με χρήση διαλυμάτων χρωστικών σε συνδυασμό με κολονοσκόπηση (χρωμοενδοσκόπηση) καθώς και εφαρμογή μεθόδων υψηλής ευκρίνειας (NBI) δίνουν τη δυνατότητα αναγνώρισης βλαβών σε ασθενείς υψηλού κινδύνου ή χρησιμεύουν συμπληρωματικά της κολονοσκόπησης σε υποψία επίπεδων βλαβών (εικόνα 16) (13). Ο προχωρημένος καρκίνος έχει συνήθως την εμφάνιση ευμεγέθους, εξωφυτικής μάζας στην περίπτωση της ενδοαυλικής ανάπτυξης ή την εικόνα στένωσης σε κυκλωτερή επέκταση (14). Μακροσκοπικά, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αδενοκαρκινωμάτων εξαρτώνται από τη θέση ανάπτυξής τους. Τα καρκινώματα του αριστερού ημίσεος, και κυρίως εκείνα που εδράζονται στο τυφλό και το κατιόν κόλο, λαμβάνουν συνήθως αυξημένες διαστάσεις και εμφανίζουν νεκρωτικές εστίες. Στο δεξιό κόλο και το ορθό οι όγκοι καταλαμβάνουν μεγαλύτερο τμήμα της περιφέρειας του αυλού δημιουργώντας μια συγκεντρική στένωση με δακτυλιοειδή εμφάνιση. Το ινώδες στοιχείο αυτών των καρκίνων ευθύνεται για την αυλική στένωση ενώ η κυκλωτερής διάταξη των λεμφαγγείων της περιοχής δίνει γένεση σε όγκους με κυκλωτερή τρόπο ανάπτυξης (13).



Εικόνα 16. Ενδοσκοπική εικόνα καρκίνου του κατιόντος κόλου, διαστάσεων 50mm, πριν και μετά τον ψεκασμό με διάλυμα indigo carmine 0,4%. {Yutaka Saito, Toshio Uraoka et al. A prospective, multicenter study of 1111 colorectal endoscopic submucosal dissections (with video). *Gastrointestinal Endoscopy* 2010; 72 (6)}

Μία στένωση στην περιοχή του παχέος εντέρου δεν σημαίνει απαραίτητα κακοήθεια. Η υποψία κακοήθειας τίθεται όταν η στένωση είναι εξελκωμένη, ασύμμετρη, εύθρυπτη και με ανώμαλα και προεξέχοντα όρια. Η λήψη, πάντως, πολλαπλών βιοψιών από την στενωτική περιοχή και η ιστοπαθολογική τους εξέταση καθώς και η κυτταρολογική εξέταση είναι εκείνες που θα θέσουν τελικά τη διάγνωση (14).

Περιστασιακά, οι ορθοκολικοί καρκίνοι έχουν επίπεδη εμφάνιση, με προεξάρχοντα τον ενδοτοιχωματικό τρόπο επέκτασης, κι αυτό παρατηρείται συχνότερα στα πλαίσια ΙΦΝΕ(13).

Η ιστοπαθολογική εξέταση είναι εκείνη που θέτει με ακρίβεια τη διάγνωση της κακοήθους νόσου και βοηθά στον καθορισμό της πρόγνωσης και του περαιτέρω χειρισμού αυτής. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) έχει προτείνει μια διεθνώς αποδεκτή ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του παχέος εντέρου (πίνακας 7)(59). Χαρακτηριστικά, τα περισσότερα καρκινώματα του παχέος εντέρου είναι αδenoκαρκινώματα, που αποτελούνται από μετρίως έως καλά διαφοροποιημένους αδένες και εκκρίνουν διάφορες ποσότητες βλεννίνης. Η βλεννίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού ΜΒ, αποτελεί το κύριο προϊόν έκκρισης τόσο των φυσιολογικών όσο και των νεοπλασματικών αδένων του εντέρου και καθίσταται καλύτερα ορατή με την εφαρμογή χρώσεων, όπως η όξινη Schiff (PAS). Όγκοι με πτωχή διαφοροποίηση χαρακτηρίζονται επίσης από σχηματισμό αδένων και παραγωγή βλεννίνης, χαρακτηριστικά όμως λιγότερο προεξάρχοντα σε σύγκριση με τους καρκίνους με ανώτερους βαθμούς διαφοροποίησης.

Ορισμένοι άλλοι όγκοι, επίσης, εμφανίζουν κύτταρα <<δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου>>, στα οποία ένα μεγάλο κενοτόπιο βλεννίνης απωθεί τον πυρήνα προς τη μια πλευρά του κυττάρου. Το 15% περίπου των όγκων αντιπροσωπεύουν τα βλενώδη ή κολλοειδή καρκινώματα τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων λιμνών από βλεννή με διάσπαρτες συλλογές καρκινικών κυττάρων.

WHO ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ
Αδενοκαρκίνωμα Μυελοειδές καρκίνωμα Βλεννώδες (κολλοειδές) αδενοκαρκίνωμα Δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου καρκίνωμα Πλακοκυτταρικό (επιδερμοειδές) καρκίνωμα Αδενοπλακοκυτταρικό Καρκίνωμα Μικροκυτταρικό καρκίνωμα Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα Άλλα (πχ θηλωματώδες)

Τα καρκινώματα αυτού του τύπου ανευρίσκονται συχνότερα σε ασθενείς με κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου (HNPCC), με ελκώδη κολίτιδα, καθώς και σε ασθενείς με νεαρή ηλικία εμφάνισης του καρκίνου. Το μυελοειδές καρκίνωμα αποτελεί έναν ιδιαίτερο τύπο καρκίνου με συμπαγή τρόπο ανάπτυξης, χωρίς την παρουσία αδένων, με διήθηση από λεμφοκύτταρα και με μικροδορυφορική αστάθεια και συσχέτιση με τον HNPCC. Κάποιες φορές οι όγκοι του παχέος εντέρου εμφανίζουν μικτή ιστολογική εικόνα, με αδένες ποικίλων βαθμών διαφοροποίησης (13).

Οι περισσότεροι ιστολογικοί τύποι δεν έχουν κάποια προγνωστική αξία. Εξαιρέσεις αποτελούν οι καρκίνοι <<δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου>> και οι μικροκυτταρικοί (με κακή πρόγνωση) και οι μυελοειδείς με ευνοϊκή πρόγνωση. Τα βλενώδη καρκινώματα, όταν σχετίζονται με μικροδορυφορική αστάθεια, έχουν επίσης καλύτερη πρόγνωση (13,59).

Άλλες μέθοδοι, όπως η αξονική τομογραφία (CT), η μαγνητική τομογραφία (MRI) και το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS), χρησιμεύουν για την ανάδειξη περιοχικής ή απομακρυσμένης μετάστασης της νόσου.

Συγκεκριμένα, η CT εμφανίζει ακρίβεια της τάξης του 85% στην απεικόνιση των ηπατικών μεταστάσεων και είναι πλέον ευαίσθητη στην ανίχνευση μεγαλύτερων παρά μικρών ηπατικών βλαβών. Η ακρίβεια της στην T σταδιοποίηση αγγίζει περίπου το 74% ενώ στην N σταδιοποίηση στον ορθικό καρκίνο είναι κατά προσέγγιση 50% - 70%.

Η MRI, αντίθετα, παρουσιάζει αυξημένη ακρίβεια στην ανίχνευση εστιακών ηπατικών μεταστάσεων καρκίνου του παχέος εντέρου, ιδιαιτέρως των μικρότερων εξ αυτών, ένεκα της τυπικά οξείας αντίθεσης μεταξύ μεταστατικών βλαβών και φυσιολογικού ηπατικού παρεγχύματος. Εμφανίζει, επιπλέον, μεγαλύτερη ειδικότητα στην εντόπιση ηπατικών μεταστάσεων από τη CT. Η CT, πάραυτα, αποτελεί την εξέταση εκλογής λόγω χαμηλότερου κόστους, μεγαλύτερης διαθεσιμότητας και περισσότερου έμπειρου επιστημονικού προσωπικού για την αξιολόγησή της.

Το EUS έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την T και N σταδιοποίηση του ορθικού καρκίνου λόγω της ελλιπούς ακρίβειας της CT για μια τέτοια πραγματοποίηση. Η προεγχειρητική TN σταδιοποίηση έχει ιδιαίτερη σημασία για τη θεραπεία του καρκίνου του ορθού: ασθενείς με επιπολής καρκίνο (T1N0) μπορεί να αντιμετωπισθούν με τοπική ενδοσκοπική ή διορθική εκτομή, ενώ ασθενείς με εν τω βάθει ενδοτοιχωματική (T3 ή T4) ή λεμφαδενική (N1 ή N2) διασπορά θα πρέπει να λάβουν ακτινοθεραπεία και πιθανόν χημειοθεραπεία πριν από το χειρουργείο. Το EUS έχει μεγαλύτερη ακρίβεια από τη CT ή την MRI τόσο για την T (85% vs 70% - 80%) όσο και για τη N (55% - 65%, 60% - 65% vs 75%) σταδιοποίηση. Το διορθικό υπερηχογράφημα προσφέρει ακόμη τη δυνατότητα βιοψίας με λεπτή βελόνη (FNA). Η χρήση του για καρκίνους κεντρικότερα του ορθού είναι περιορισμένη (14).

Ο βαριούχος υποκλυσμός (BE) έχει μικρή ευαισθησία στην αναγνώριση βλαβών < 1cm ενώ, όπως αναφέρεται, υπάρχει κατά προσέγγιση πιθανότητα 1:5 να μην ανιχνευθεί με αυτή τη μέθοδο η παρουσία ΚΠΕ.

Η εικονική κολonosκόπηση από την άλλη, που συνίσταται σε απεικόνιση του παχέος εντέρου με αξονική ή μαγνητική τομογραφία και στη συνέχεια ανασύνθεση και ανάλυση των εικόνων με ειδικά προγράμματα λογισμικού, φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερη ευαισθησία για πολύποδες > 1cm. Επιπρόσθετα ζητήματα όπως η ανάγκη εντερικής προετοιμασίας ή η ικανότητα ανίχνευσης επίπεδων βλαβών αποτελούν επιπλέον μειονεκτήματα.

13. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η πρόληψη του ΚΠΕ μπορεί να διακριθεί σε πρωτογενή και δευτερογενή.

Η πρωτογενής πρόληψη αφορά τόσο την αναγνώριση γενετικών, βιολογικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων με αιτιοπαθογενετικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου όσο και τη δυνατότητα παρέμβασης για μετατροπή των επιδράσεων αυτών των παραγόντων στην όλη διαδικασία.

Η δευτερογενής πρόληψη στοχεύει στην αναγνώριση συμπτωματικών ή ασυμπτωματικών προυπαρχουσών προκαρκινικών και πρώιμων νεοπλασματικών βλαβών και στην έγκαιρη και αποτελεσματική αντιμετώπισή τους με βάση το σκεπτικό ότι η έγκαιρη ανίχνευση βελτιώνει την πρόληψη.

Ο προσυμπτωματικός έλεγχος (screening) έχει εφαρμογή σε μεγάλους πληθυσμούς και η χρησιμότητά του είναι δεδομένη όταν πρόκειται για νόσο που αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας και για την οποία υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία ενώ ταυτόχρονα υφίσταται ευαίσθητη και ειδική δοκιμασία ανίχνευσής της, αποδεκτή από ασθενείς και ιατρούς και με λογικό κόστος. Ο ΚΠΕ πληροί τα περισσότερα από τα ανωτέρω κριτήρια γεγονός που καθιστά εξαιρετικά σημαντική την ύπαρξη προγραμμάτων προληπτικού ελέγχου για τη νόσο (13).

Κατευθυντήριες οδηγίες για προληπτικό έλεγχο για ΚΠΕ έχουν δημοσιευθεί από διάφορους οργανισμούς και με πρόσφατες αναθεωρήσεις. Αν και υφίστανται διαφορές από χώρα σε χώρα, οι κατευθυντήριες οδηγίες από τη Μ. Βρετανία και την Αμερική

συμφωνούν σε γενικές γραμμές ως το ποιος, τότε και με ποια συχνότητα θα πρέπει να υποβληθεί σε προσυμπτωματικό έλεγχο (41). Σε κάθε περίπτωση σημαίνουσα είναι η διάκριση των πληθυσμών στους οποίους αποτείνονται: ομάδες με μέσο όρο επικινδυνότητας ή ομάδες με υψηλή επικινδυνότητα για ΚΠΕ. Η ομάδα με μέσο όρο επικινδυνότητας περιλαμβάνει όλα τα άτομα με ηλικία ≥ 50 ετών, τα οποία δεν εμπίπτουν στην κατηγορία αυξημένου κινδύνου. Στην ομάδα υψηλού κινδύνου ανήκουν οι ασθενείς με μακροχρόνιο ιστορικό ΙΦΝΕ, με ατομικό ιστορικό αδενωμάτων, ΚΠΕ ή καρκίνου του γεννητικού συστήματος, με HNPCC, σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης ή Peutz-Jeghers καθώς και με οικογενειακό ιστορικό αδενωματωδών πολυπόδων, FAP ή ΚΠΕ (13).

Σύμφωνα με τις Αμερικανικές κατευθυντήριες οδηγίες, οι δοκιμασίες προληπτικού ελέγχου για ΚΠΕ διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: δοκιμασίες κοπράνων – για ανίχνευση πρώιμων καρκινικών βλαβών – και δοκιμασίες ελέγχου της δομικής ακεραιότητας του παχέος εντέρου, που στοχεύουν στην ανίχνευση πρώιμων καρκινικών αλλά και προκαρκινικών αλλοιώσεων.

Οι μη επεμβατικές δοκιμασίες κοπράνων χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση λανθάνουσας απώλειας αίματος στα κόπρανα και περιλαμβάνουν διάφορες μεθόδους όπως τη δοκιμασία Mayer, τη δοκιμασία γουαϊάκης (FOBT) ή τη νεότερη ανοσοϊστοχημική δοκιμασία με χρήση αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων συστατικών του αίματος (41,64).

Η δοκιμασία Mayer, παρά την αποτελεσματικότητα που επιδεικνύει σε τυχαίοποιημένες μελέτες και το χαμηλό της κόστος δεν συμβάλλει ιδιαίτερα στη μείωση της θνησιμότητας (15% - 35%) (41). Όσον αφορά τη δοκιμασία FOBT, αυτή ανιχνεύει κυρίως τη δραστηριότητα της περοξειδάσης της αίμης και δεν έχει ειδικότητα για το ανθρώπινο αίμα. Ως εκ τούτου, η δοκιμασία μπορεί να αποδειχθεί ψευδώς θετική σε ασθενείς που καταναλώνουν κόκκινο κρέας ή τροφές που περιέχουν περοξειδάση και ψευδώς αρνητική σε εκείνους που λαμβάνουν βιταμίνη C και για αυτό το λόγο συστήνεται η διακοπή πρόσληψης τέτοιων προϊόντων τρεις ημέρες πριν τη δοκιμασία – σύσταση με την οποία όμως είναι άγνωστο εάν υπάρχει συμμόρφωση. Η ανίχνευση μεγάλων πολυπόδων ή καρκίνου βελτιώνεται με τη λήψη 2 ή 3 δειγμάτων κοπράνων σε διαφορετικές ημέρες. Ασθενείς με θετική δοκιμασία FOBT έχουν 3 έως 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο σε σύγκριση με εκείνους με αρνητική δοκιμασία. Όταν η δοκιμασία εφαρμοσθεί μόνο μια φορά (με 3 δείγματα κοπράνων) δεν έχει μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση νεοπλασίας (13% – 50% των ασθενών με καρκίνο και 11% - 24% αυτών με αδενώματα: σωληνώδη $\geq 10\text{mm}$ ή με λαχνωτό ιστολογικό τύπο ή με υψηλόβαθμη δυσπλασία). Η αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας βασίζεται στον προγραμματισμό της κατ'έτος επανάληψής της στην περίπτωση που είναι αρνητική ενώ εάν είναι θετική συστήνεται η περαιτέρω διενέργεια κολοσκόπησης.

Η ανοσοϊστοχημική δοκιμασία – μια νεότερη δοκιμασία κατά την οποία χρησιμοποιούνται αντισώματα ειδικά για την ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη, την αλβουμίνη ή άλλα συστατικά του αίματος – είναι περισσότερο ειδική για το ανθρώπινο αίμα, εμφανίζει, εν γένει, ποσοστά ανίχνευσης καρκίνου μεγαλύτερα από 50% σε λήψη 1 – 3 δειγμάτων κοπράνων και δίδει σπανιότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που να

έχουν σχέση με τη δίαιτα. Η ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση προχωρημένης νεοπλασίας είναι μικρότερη από 50% (στις περισσότερες μελέτες 25% - 30%) - με εξαίρεση την ποσοτική μέθοδο όπου το ποσοστό αγγίζει το 67% - κι ως εκ τούτου η χρησιμότητά της για ανίχνευση και αφαίρεση πρωιμότερων βλαβών είναι περιορισμένη.

Εκτός από τις παραπάνω μεθόδους ανίχνευσης αίματος, υπάρχουν και δοκιμασίες ανίχνευσης μεταλλάξεων σχετικών με ΚΠΕ στα κόπρανα. Πρόσφατες ανακοινώσεις (2007 – 2008) αναφέρουν ποσοστά 87% για την ανίχνευση καρκίνου και 40% για προχωρημένη νεοπλασία με τη χρήση δοκιμασίας DNA κοπράνων. Απαιτούνται, πάραυτα, περαιτέρω μελέτες για τον καθορισμό των κατάλληλων χρονικών διαστημάτων διενέργειας του ελέγχου και του χειρισμού ασθενών με μεταλλάξεις στα κόπρανα και με αρνητική ως προς τα ευρήματα κολοσκόπηση.

Οι εξετάσεις ελέγχου της δομικής ακεραιότητας του παχέος εντέρου περιλαμβάνουν την εικονική κολοσκόπηση, την κολοσκόπηση με βιντεοκάψουλα και την ορθοσιγμοειδοσκόπηση / ολική κολοσκόπηση. Νεώτερες εξετάσεις, όπως η NBI ενδοσκόπηση και η χρωμοενδοσκόπηση δεν συνιστούν επί του παρόντος εξετάσεις ρουτίνας.

Η εικονική κολοσκόπηση, με την πρόοδο που έχει επέλθει τα τελευταία 10 χρόνια στην τεχνολογία των συστημάτων της πληροφορικής, εμφανίζει βελτίωση της ποιότητάς της και ποσοστά ανίχνευσης πολυπόδων > 10mm μεγαλύτερα από το βαριούχο υποκλυσμό, ο οποίος πλέον δεν συστήνεται για έλεγχο ρουτίνας. Μελέτες σύγκρισης της μεθόδου με την κολοσκόπηση, έδειξαν ότι η εικονική κολοσκόπηση ανιχνεύει το 90% των πολυπόδων με μέγεθος $\geq 10\text{mm}$, ποσοστό παρόμοιο με εκείνο της ενδοσκοπικής εξέτασης. Επιπλέον, η μέθοδος είναι λιγότερο επεμβατική, δεν απαιτεί καταστολή, ενέχει μικρότερους κινδύνους για διάτρηση, απεικονίζει και εξωεντερικές κοιλιακές δομές και ολοκληρώνεται εντός ολίγων λεπτών. Το γεγονός, όμως, ότι εάν ανευρεθούν πολύποδες απαιτείται εκ νέου εντερική προετοιμασία για την ενδοσκοπική αφαίρεσή τους σε συνδυασμό με τα χαμηλά ποσοστά ανίχνευσης πολυπόδων < 10mm – ίδια αυτών με μέγεθος < 6mm - και των κινδύνων της έκθεσης σε ακτινοβολία καθιστά αμφίβολη την εφαρμογή της εξέτασης για έλεγχο ρουτίνας. Η ενδοσκόπηση με βιντεοκάψουλα έχει τύχει επιτυχούς εφαρμογής για την απεικόνιση του ανώτερου πεπτικού σωλήνα και του λεπτού εντέρου. Πρόκειται ουσιαστικά για μια μη αποδομήσιμη κάψουλα, με βιντεοκάμερα στις δύο της άκρες, που μπορεί να λαμβάνει φωτογραφίες κατά την δίοδό της κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα. Οι εικόνες αυτές στη συνέχεια μεταβιβάζονται σε μια συσκευή καταγραφής και μπορούν να εμφανισθούν σε οθόνη υπολογιστή. Οι νεώτερες συσκευές φέρουν μπαταρίες με διάρκεια ζωής τέτοια που να επιτρέπει την απεικόνιση ολόκληρου του παχέος εντέρου. Μελέτη σύγκρισης της ενδοσκοπικής κάψουλας με την ενδοσκόπηση, έδειξε ότι η ενδοσκοπική κάψουλα ανίχνευσε το 73% των προχωρημένων αδενωμάτων και το 74% όλων των περιπτώσεων καρκίνου ενόσω η συμβατική ενδοσκόπηση ανιχνεύει περί το 90% των πολυπόδων με μέγεθος $\geq 10\text{mm}$. Η ανάγκη ενδεδειγμένης εντερικής προετοιμασίας καθώς και η επίδραση της κινητικότητας του πεπτικού σωλήνα στην ακρίβεια της απεικόνισης αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την έκβαση της εξέτασης. Η μειωμένη κινητικότητα μπορεί να οδηγήσει σε βραδεία

πρόοδο της εξέτασης με απενεργοποίηση της μπαταρίας πριν την ολοκλήρωση αυτής (αναφέρεται στο 10% των περιπτώσεων) ενώ η αυξημένη κινητικότητα σε ανεπαρκή απεικόνιση. Και με αυτή την εξέταση, η ανεύρεση πολύποδα ή καρκίνου απαιτεί περαιτέρω έλεγχο με κολοσκόπηση.

Τόσο η ορθοσιγμοειδοσκόπηση – ενδοσκοπικός έλεγχος των τελευταίων 50 – 60cm του παχέος εντέρου – όσο και η κολοσκόπηση (ενδοσκοπικός έλεγχος ολόκληρου του παχέος εντέρου) παρέχουν τη δυνατότητα αφαίρεσης πολυπόδων και λήψης βιοψιών από αυτούς – σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεθόδους ελέγχου που προαναφέρθηκαν. Την τελευταία δεκαετία, έχει σημειωθεί εξαιρετική πρόοδος στις μεθόδους ενδοσκόπησης (χρωμοενδοσκόπηση, ενδοσκόπηση υψηλής ευκρίνειας, μεγεθυντική ενδοσκόπηση, NBI ενδοσκόπηση κοκ) η οποία έχει ως αντίκτυπο την αύξηση της ανίχνευσης πολυποειδών βλαβών. Η πλέον υποσχόμενη από αυτές τις μεθόδους είναι η χρωμοενδοσκόπηση με χρήση ειδικών χρώσεων, όπως η ιντιγκοκαρμίνη, η οποία έχει ιδιαίτερη θέση στη ανίχνευση και διερεύνηση επίπεδων βλαβών (64).

Η κολοσκόπηση εμφανίζει υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση πολυπόδων > 1cm, με μόνο ένα 6% να διαφεύγει της διάγνωσης ενώ η ευαισθησία της για την ανίχνευση μικροσκοπικών πολυπόδων (< 0,5cm) είναι μικρότερη, με ποσοστό διαφυγής από τη διάγνωση περίπου 27%. Οι πολύποδες που δεν ανιχνεύονται βρίσκονται συνήθως πλησίον αποτόμων καμπών – ιδία στη σπληνική και στο σιγμοειδές – , σε περιοχές με έντονο σπασμό (κυρίως στο σιγμοειδές και σε εκτεταμένη εκκολπωματική νόσο), και σε περιοχές με κοπρανώδες υλικό ένεκα ανεπαρκούς εντερικής προετοιμασίας. Οι καρκινικές εστίες σπάνια διαφεύγουν της διάγνωσης λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους. Τα κύρια μειονεκτήματα της εξέτασης είναι ότι είναι δαπανηρή, επεμβατική, μη καλώς πάντοτε ανεκτή από τον ασθενή και με κίνδυνο επιπλοκών. Απαιτεί την ύπαρξη ομάδας (ιατρός, νοσηλεύτης) και την έναρξη της εντερικής προετοιμασίας 24 τουλάχιστον ώρες πριν από την εξέταση. Το ποσοστό εμφάνισης επιπλοκών σε μια διαγνωστική κολοσκόπηση είναι περίπου 0,4%. Οι συχνότερες επιπλοκές είναι η αιμορραγία και η διάτρηση, η οποία συνήθως χρήζει χειρουργικής αποκατάστασης (40). Σύμφωνα με τις πλέον πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες του Αμερικανικού Κολλεγίου Γαστρεντερολογίας – οι οποίες δημοσιεύθηκαν το 2008 – η κολοσκόπηση αποτελεί την εξέταση επιλογής για τον προληπτικό έλεγχο για ΚΠΕ. Για άτομα με συνήθη κίνδυνο για ΚΠΕ (πχ άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ) ο προληπτικός έλεγχος συστήνεται να άρχεται στην ηλικία των 50 ετών και να επαναλαμβάνεται ανά 10 έτη (5 έτη για την Ευρώπη), με εξαίρεση τους Αφροαμερικανούς στους οποίους θα πρέπει να ξεκινά στην ηλικία των 45 ετών. Εναλλακτικά, για ασθενείς που αρνούνται να υποβληθούν σε κολοσκόπηση ή όταν η εξέταση δεν είναι διαθέσιμη ή δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί, ο έλεγχος θα πρέπει να πραγματοποιείται με ορθοσιγμοειδοσκόπηση κάθε 5 – 10 χρόνια ή εικονική κολοσκόπηση ανά 5 χρόνια ή τέλος με FOBT για ανίχνευση αίματος στα κόπρανα ανά έτος (13,40).

Με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Γαστρεντερολογικής Εταιρείας, τα άτομα με συνήθη κίνδυνο και ηλικία > 50 ετών θα πρέπει να υποβάλλονται σε ετήσιο έλεγχο κοπράνων για λανθάνουσα απώλεια αίματος (Mayeγ κοπράνων), ορθοσιγμοειδοσκόπηση ανά 5 έτη και κολοσκόπηση ανά 10 έτη μέχρι την ηλικία των 75 ετών (41).

Οι γυναίκες έχουν μειωμένο – σχετιζόμενο με την ηλικία έναρξης – κίνδυνο ΚΠΕ και ευμεγέθων πολυπόδων (> 9cm) σε σύγκριση με τους άνδρες. Έτσι, ένας άνδρας 50 ετών έχει τον ίδιο περίπου κίνδυνο για ΚΠΕ με μία γυναίκα 58 ετών. Σύμφωνα με διαθέσιμα στοιχεία, οι γυναίκες έχουν σχετικά χαμηλό κίνδυνο για ΚΠΕ μέχρι την εμμηνόπαυση, ενώ μετεμμηνοπαυσιακά μπορούν να έχουν περαιτέρω προστασία με θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης. Άλλες μελέτες αναφέρουν παρόμοιο κίνδυνο ηλικιακά και για τα δύο φύλα. Για λόγους αποτελεσματικότερης συμμόρφωσης, πάντως, οι κατευθυντήριες οδηγίες είναι οι ίδιες και για τα δύο φύλα.

Επίσης, στη μαύρη φυλή – λόγω υψηλότερης επίπτωσης ΚΠΕ – ο προληπτικός έλεγχος για τα άτομα συνήθους κινδύνου θα πρέπει να ξεκινά στα 45 έτη.

Όσον αφορά την ηλικία όπου θα πρέπει να σταματήσει η διενέργεια προληπτικού ελέγχου, μελέτες αναφέρουν ότι μετά τα 75 έτη το όφελος είναι ελαττωμένο, ενώ στην ηλικία των 85 ετών οι κίνδυνοι υπερτερούν του οφέλους. Οι συστάσεις για τα άτομα ηλικίας 75 – 85 ετών θα πρέπει είναι εξατομικευμένες ανάλογα με το ιστορικό αυτών(64).

Για άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου, η ηλικία έναρξης ενδοσκοπικού ελέγχου ποικίλει και εξαρτάται από την ηλικίας έναρξης κινδύνου και τον αθροιστικό κίνδυνο για ΚΠΕ. Αναλυτικότερα, οι οδηγίες έχουν ως εξής:

Άτομα με οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ (όχι κληρονομικό μη πολυποδιασικό ΚΠΕ)

- με ένα συγγενή α΄ βαθμού με ΚΠΕ ή προχωρημένο αδένωμα που διαγνώσθηκε σε ηλικία ≥ 60 ετών
 - ➔ α΄ κολοноσκόπηση στην ηλικία των 40 ετών. Σε αρνητική ευρημάτων εξέταση: ό,τι ισχύει για τα άτομα με μέσο κίνδυνο (ανά 10 έτη)
- με ένα συγγενή α΄ βαθμού με ΚΠΕ ή προχωρημένο αδένωμα που διαγνώσθηκε σε ηλικία < 60 ετών ή με δύο συγγενείς α΄ βαθμού με ΚΠΕ ή προχωρημένο αδένωμα
 - ➔ κολοσκόπηση ανά 5 χρόνια με έναρξη την ηλικία των 40 ετών ή 10 έτη νωρίτερα από τη μικρότερη ηλικία διάγνωσης της νόσου

Άτομα με οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (FAP)

- Ασθενείς με FAP ή πιθανή διάγνωση FAP λόγω οικογενειακού ιστορικού (χωρίς γενετικό έλεγχο)
 - ➔ ορθοσιγμοειδοσκόπηση ή κολοσκόπηση ετησίως, με ηλικία έναρξης τα 12 έτη, μέχρι την κολεκτομή
- Ασθενείς με διατήρηση του ορθού μετά υφολική κολεκτομή
 - ➔ ορθοσιγμοειδοσκόπηση κάθε 6 – 12 μήνες

Άτομα με σύνδρομο Lynch

- Ασθενείς που ικανοποιούν τα κριτήρια Bethesda
 - ➔ έλεγχο του καρκίνου τους ή του καρκίνου μέλους της οικογένειάς τους για μικροδορυφορική αστάθεια ή διαταραχές πρωτεϊνών επιδιόρθωσης με ανοσοϊστοχημική χρώση

- Ασθενείς με θετικό γενετικό έλεγχο
 - ➔ κολοσκόπηση ανά διαιτία με ηλικία έναρξης 20 -25 έτη μέχρι την ηλικία των 40 ετών. Στη συνέχεια κολοσκόπηση ετησίως.
Παράλληλος έλεγχος για καρκίνο ενδομητρίου, ωοθηκών, παγκρέατος, στομάχου, λεπτού εντέρου, ουροποιητικού(65).

14. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΟΛΥΠΟΔΩΝ – ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

14Α) ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ

Η ανίχνευση ενός πολύποδα κατά τη διάρκεια μιας κολοσκόπησης παρέχει τη δυνατότητα λήψης ιστοτεμαχίων αυτού προς ιστολογική εξέταση, ενδοσκοπικής αφαίρεσης αυτού και διερεύνησης για την παρουσία σύγχρονων νεοπλασιών. Επειδή η αρνητική ιστολογική εξέταση δειγμάτων ενός πολύποδα δεν αποκλείει την ύπαρξη καρκίνου σε αυτόν, σε κάθε περίπτωση απαιτείται ολική αφαίρεση του πολύποδα για την απόκτηση μιας αξιόπιστης διάγνωσης. Στις περιπτώσεις ευμεγεθών πολυπόδων, μπορεί να απαιτηθεί τμηματική εκτομή αυτών ενώ σε μη επαρκώς επηρμένους βλάβες η έγχυση φυσιολογικού ορού στη βάση του πολύποδα θα βοηθήσει στη δημιουργία υπέγερσης για ασφαλή και αποτελεσματική εκτομή. Κατόπιν μιας φαινομενικά ολικής αφαίρεσης ενός πολύποδα απαιτείται επανάληψη κολοσκόπησης μετά 3 – 6 μήνες για επιβεβαίωση της καθολικότητας της εκτομής. Πολύποδες των οποίων η ολική αφαίρεση δεν καθίσταται δυνατή μετά από 2 έως 3 προσπάθειες, θα πρέπει να αφαιρούνται χειρουργικά.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον και σοβαρότητα παρουσιάζει η αντιμετώπιση των κακοηθών πολυπόδων, των αδενωμάτων δηλαδή που φέρουν εστία καρκινώματος η οποία έχει επεκταθεί πέραν της βλεννογονίου μυϊκής στιβάδας στον υποβλεννογόνο χιτώνα (όχι δηλ. καρκίνο in situ ή ενδοβλεννογόνο καρκίνο). Οι κακοήθεις πολύποδες αντιμετωπίζονται ενδοσκοπικά, με ολική αφαίρεση και περαιτέρω ιστολογική εξέταση. Η ενδοσκοπική αφαίρεσή τους εγείρει πάραυτα δυο κρίσιμα ερωτήματα : είναι επαρκής ως μέθοδος αντιμετώπισης? κι αν όχι με βάση ποια χαρακτηριστικά μπορεί να προβλεφθεί η ύπαρξη υπολειμματικής νόσου ή υποτροπής? Το βάθος διείσδυσης, ο βαθμός διαφοροποίησης και η καθολικότητα της αφαίρεσης αποτελούν παράγοντες πρόγνωσης της περαιτέρω έκβασης και του χειρισμού των ασθενών. Στους ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες περιλαμβάνονται η ύπαρξη καλού ή μέτριου βαθμού διαφοροποίησης του καρκινώματος, η απουσία διήθησης αγγείων ή λεμφαγγείων ή του υποβλεννογονίου χιτώνα καθώς και η περίπτωση τα όρια της πολυπεκτομής να είναι ελεύθερα ή > 2mm. Σε αυτή την κατηγορία ασθενών η ενδοσκοπική αφαίρεση θεωρείται επαρκής μέθοδος αντιμετώπισης και θα πρέπει να ακολουθήσει επαναληπτική κολοσκόπηση στους 3 μήνες προς επιβεβαίωση της αποτελεσματικής εκτομής. Η ύπαρξη ενός τουλάχιστον κακού προγνωστικού χαρακτηριστικού αυξάνει την πιθανότητα δυσμενούς έκβασης του ασθενούς στο 10% έως 25% περίπου. Δυσμενής έκβαση ενδοσκοπικής εκτομής κακοήθους πολύποδα αναφέρεται στο 10% των περιπτώσεων και οφείλεται στην παρουσία υπολειμματικής νόσου στο εντερικό τοίχωμα ή στους λεμφαδένες κατά το χρόνο της πολυπεκτομής ή αργότερα στον

επαναληπτικό έλεγχο. Σε αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να ακολουθεί χειρουργική αντιμετώπιση, συνυπολογίζοντας πάντοτε τους εγχειρητικούς κινδύνους σε ασθενείς με επιβαρυσμένη γενική κατάσταση.

14B) ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η θεραπεία εκλογής για τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι η χειρουργική αφαίρεση αυτού. Στόχος της θεραπείας είναι η ευρεία εκτομή του εμπλεκόμενου τμήματος του εντέρου με ταυτόχρονη αφαίρεση της λεμφαγγειακής παροχής του.

Προεγχειρητικά επιβάλλεται η διενέργεια ολικής κολοσκόπησης – όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί -, η μέτρηση των επιπέδων CEA- ως τιμές αναφοράς για τη μετεγχειρητική παρακολούθηση - και η πραγματοποίηση CT για τη σταδιοποίηση της νεοπλασματικής νόσου. Η προεγχειρητική διενέργεια CT μπορεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμη για εκτίμηση εστιών μεταστατικής νόσου στο ήπαρ στην περίπτωση πραγματοποίησης μερικής ηπατεκτομής ή χημειοθεραπείας, από τη στιγμή που για ορισμένα θεραπευτικά κέντρα η χορήγηση μιας συνεδρίας χημειοθεραπείας σε ασθενείς με ηπατικές μεταστάσεις πριν την εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου αποτελεί κοινή πρακτική με τη λογική ότι εάν δεν υπάρξει ανταπόκριση, η εκτομή του όγκου δεν έχει νόημα θεραπευτικά.

Το εύρος της εκτομής εξαρτάται από την παροχή αίματος στο εντερικό τμήμα και την κατανομή των επιχώριων λεμφαδένων. Τα όρια της εκτομής θα πρέπει να περιλαμβάνουν εντερικά τμήματα με μήκος τουλάχιστον 5cm εκατέρωθεν του όγκου. Στην πραγματικότητα, οι εκτομές έχουν ευρύτερα όρια κι αυτό λόγω της υποχρεωτικής απολίωσης της αιματικής κυκλοφορίας. Για τον καρκίνο του ορθού, το είδος της χειρουργικής προσέγγισης εξαρτάται από την εντόπιση της βλάβης : όγκοι στο ορθοσιγμοειδές ή στην άνω μοίρα του ορθού αντιμετωπίζονται με χαμηλή προσθία εκτομή και δημιουργία πρωτογενούς αναστόμωσης. Ακόμη και για νεοπλασίες στην κατώτερη μοίρα του ορθού, είναι δυνατή η εκτομή τους με διατήρηση του σφιγκτήρα εφόσον υπάρχει η δυνατότητα αφαίρεσης τουλάχιστον 2cm φυσιολογικού ιστού από το περιφερικό όριο της βλάβης. Η αδυναμία διατήρησης επαρκούς περιφερικού τμήματος του ορθού (τουλάχιστον 2cm όριο), η παρουσία ογκώδους νεοπλασίας εντός της πυέλου, και η εκτεταμένη τοπική διασπορά του όγκου απαιτούν τη διενέργεια κοιλιοπερινεϊκής εκτομής, κατά την οποία το άπω σιγμοειδές, το ορθοσιγμοειδές, το ορθό και ο πρωκτός αφαιρούνται χειρουργικά με ταυτόχρονη δημιουργία μόνιμης σιγμοειδικής κολοστομίας.

Λόγω του κινδύνου απόφραξης ή αιμορραγίας, ο ΚΠΕ θα πρέπει να αφαιρείται σε κάθε περίπτωση, ακόμη και παρουσία ηπατικών μεταστάσεων. Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο αλλά και με βεβαρυσμένη κατάσταση υγείας, θα πρέπει να προτιμάται η παρηγορητική θεραπεία των ορθικών όγκων με μεθόδους ηλεκτροκαυτηρίασης, φωτοπηξίας, τήξης με argon plasma ή ενδοσκοπικής αφαίρεσης με περιβροχισμό της βλάβης.

Επειδή η πρόγνωση των ασθενών με χειρουργικώς αντιμετωπισθέντα ΚΠΕ εξαρτάται απόλυτα από το στάδιο της νεοπλασματικής νόσου κατά το χρόνο της επέμβασης, οι ασθενείς με διήθηση του ορογόνου χιτώνα ή των επιχώριων λεμφαδένων εμφανίζουν συνήθως υψηλά ποσοστά υποτροπής της κακοήθειας. Σε αυτή την ομάδα ασθενών –

και συγκεκριμένα σε στάδια νόσου T1-4, N1-2, M0 (στάδιου II) - συστήνεται η χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας για την εκρίζωση μικροσκοπικών καρκινικών εστιών δεδομένου ότι η θεραπεία είναι περισσότερο αποτελεσματική όταν το φορτίο της κακοήθειας είναι το ελάχιστο και η κινητική των κυττάρων η βέλτιστη (13).

Χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας θα πρέπει πιθανόν να διενεργηθεί και σε επιλεγμένες περιπτώσεις ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες (σταδίου II), ιδιαίτερα εάν αυτοί έχουν παράγοντες υψηλού κινδύνου για υποτροπή. Οι γνωστότεροι παράγοντες υψηλού κινδύνου σε ασθενείς με ΚΠΕ σταδίου II είναι: T4, πτωχά διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα / αδιαφοροποίητο καρκίνωμα, διήθηση αγγείων ή λεμφαγγείων ή νεύρων, όγκος πρωτοεμφανιζόμενος με απόφραξη ή διάτρηση, < 12 διερευνηθέντες επιχώριοι λεμφαδένες, υψηλές προεγχειρητικά τιμές CEA, μεταβολές μοριακών δεικτών, ανευπλοειδία περιεχομένου DNA και έκφραση συγκεκριμένων καρκινικών αντιγόνων ή άλλων γενετικών παραγόντων (πχ MSI status) (13,66). Ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική εξαίρεση μεμονωμένων ηπατικών ή πνευμονικών μεταστάσεων θα πρέπει, επίσης, να λαμβάνουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία (13).

Η τρέχουσα πρότυπη συμπληρωματική θεραπεία περιλαμβάνει χημειοθεραπευτικούς παράγοντες με βάση τη φθοριοπυριμιδίνη που φαίνεται ότι επιτυγχάνουν στατιστικά σημαντικά ποσοστά επιβίωσης. Η 5-φθοριοουρακίλη (5-FU), αποτελεί τον παράγοντα που έχει μελετηθεί πλέον εκτενώς για την αντιμετώπιση του ΚΠΕ. Για τη βελτίωση της χρησιμότητας της 5-FU είναι απαραίτητη η χορήγησή της σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι αυτοί που επιφέρουν εκλεκτική βλάβη στο DNA και αναστολή της αγγειογένεσης και των οδών μετάδοσης του σήματος κυτταρικής αύξησης. Ο εκλεκτικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση microRNAs ή μορίων ομοιοζόντων με RNA θέτει πολλές προσδοκίες ενώ η χρησιμοποίηση αναστολέων πρωτεασώματος έχει επιφέρει αρκετές εκπλήξεις στο πεδίο της χημειοθεραπείας. Τα δύο σχήματα με βάση τη 5-FU που εφαρμόζονται ευρύτερα είναι: 5-FU, λευκοβορίνη (LV) και οξαλιπλατίνη (FOLFOX) και 5-FU, λευκοβορίνη και ιρινοτεκάνη (FOLFIRI) με ισοδύναμη κλινική δραστηριότητα αλλά διαφορετικό προφίλ ασφάλειας: περιφερική αισθητικού τύπου νευροπάθεια με την οξαλιπλατίνη και γαστρεντερική τοξικότητα πιο συχνά με την ιρινοτεκάνη. Τα τριπλά σχήματα έχουν βελτιώσει σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης χωρίς νόσο σε ασθενείς με ΚΠΕ σταδίου II ή III αλλά και τη συνολική επιβίωση στους ασθενείς με νόσο σταδίου III σε σύγκριση με το διπλό σχήμα 5-FU / LV (5ετής επιβίωση χωρίς νόσο 73,3% vs 67,4% για FOLFOX και 5-FU/ LV αντίστοιχα) (67).

Για τον καρκίνο του ορθού, η συμπληρωματική θεραπεία παρουσιάζει διαφοροποιήσεις. Καθώς είναι δύσκολο να επιτευχθούν ευρέα όρια εκτομής του όγκου, τα ποσοστά τοπικής υποτροπής αγγίζουν το 25% έως 30% για καρκίνο σταδίου II, και το 50% για καρκίνους σε στάδιο III. Η τοπική υποτροπή συνδέεται με αυξημένη θνησιμότητα (13). Μελέτες έχουν δείξει σημαντική μείωση στα ποσοστά τοπικής υποτροπής σε ασθενείς που έλαβαν προεγχειρητικά ή/και μετεγχειρητικά μέτρες έως υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, χωρίς όμως σημαντική επίδραση στη συστηματική υποτροπή και στην επιβίωση. Η συνδυαστική χορήγηση συμπληρωματικής ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας φαίνεται ότι ελαττώνει τα ποσοστά τόσο της

ρύθμιση της β-κατενίνης, ένας μηχανισμός ελάττωσης των επιπέδων β-κατενίνης θα είχε ιδιαίτερη χρησιμότητα. Ακόμη και αν τα miRNAs δεν γίνουν ποτέ επιτυχείς θεραπευτικοί παράγοντες, η ανάλυσή τους θα έχει πιθανά ιδιαίτερη αξία για τη διάγνωση, τη σταδιοποίηση και τον περαιτέρω έλεγχο του ΚΠΕ καθώς και για την εξατομίκευση της θεραπείας.

Όσον αφορά τη δράση άλλων παραγόντων για τη θεραπεία του ΚΠΕ, εδώ και πολλά χρόνια φαίνεται ότι ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συνδυαστική χορήγηση ενός παράγοντα που προκαλεί βλάβη στο DNA με έναν αναστολέα επιδιόρθωσης του DNA. Οι χλωροαιθυλνιτροζουρίες πιθανόν να λειτουργούν προς αυτή την κατεύθυνση παρότι δεν έχουν επιδείξει σημαντικά αποτελέσματα στη θεραπεία του ΚΠΕ. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες - στόχοι προς αναστολή επιδιόρθωσης του DNA, όπως η DNA πολυμεράση β. Ένας αναστολέας της DNA πολυμεράσης β προκάλεσε αύξηση στην ικανότητα της temozolomide να αναστείλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Άλλοι παράγοντες με παρόμοια δράση είναι οι αναστολείς poly(ADP-ribose) πολυμεράσης (πχ olaparib) που σε συνδυασμό με παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA (temozolomide) αναστέλλουν την ανάπτυξη ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια.

Η διαθεσιμότητα διαδικασιών για προληπτικό έλεγχο μεταβολών στη γονιδιακή έκφραση έχει διευκολύνει την αναγνώριση γονιδίων των οποίων η έκφραση είτε ρυθμίζεται προς τα άνω ή προς τα κάτω στον ΚΠΕ (p53, PIK3CA, KRAS, APC, COX-2, LINE-1, MGMT, p27, p16, FASN, AURAK, BRAF). Η έκφραση αυτών των γονιδίων έχει συγκριθεί μεταξύ καρκίνου πρωίμου σταδίου και μεταστατικού ΚΠΕ. Ένα σύνολο 128 γονιδίων αναγνωρίστηκε να σχετίζεται με διασπορά του καρκίνου. Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι τα γονίδια που ρυθμίζονται προς τα άνω σε μεταστατικό καρκίνο ταξινομούνται σε δύο λειτουργικές κατηγορίες: αλληλεπίδρασης στο εξωκυττάριο υγρό και μετάδοσης κυτταρικού σήματος. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ιντεγκρίνες (ITGB1, ITGB5), το κολλαγόνο (COL5A1), η φιβρονεκτίνη 1 (FN1) και η εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη 1 (SPP1). Στη β' κατηγορία ανήκουν τα μονοπάτια μετάδοσης σήματος TGF-β, VEGF και Wnt. Οι προς τα άνω ρυθμιζόμενες γονιδιακές εκφράσεις αποτελούν εν δυνάμει στόχους θεραπευτικών παρεμβάσεων, είτε σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης ή αναστολής πρωτεϊνικής λειτουργίας. Η ενεργοποίηση μιας προς τα κάτω ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης ή πρωτεϊνικής λειτουργίας αποτελεί έναν σαφώς δυσχερέστερο θεραπευτικό στόχο (69).

Το ήπαρ αποτελεί τη συχνότερη θέση απομακρυσμένων μεταστάσεων του ΚΠΕ. Σύγχρονες ηπατικές μεταστάσεις εμφανίζει το 10% έως 25% των ασθενών με νεοδιαγνωσθέντα ευμεγέθη ΚΠΕ, ενώ το 70% - 80% των ηπατικών μεταστάσεων εμφανίζονται εντός 2 ετών από την αρχική εκτομή. Η παρουσία ηπατικών μεταστάσεων υποδεικνύει επιθετικό στάδιο της νόσου και για αυτό επιβάλλεται η χειρουργική, ει δυνατόν, αφαίρεσή τους. Η έκταση της εκτομής ποικίλλει ανάλογα με το εάν ο μεταστατικός καρκίνος περιορίζεται στον ένα ηπατικό λοβό ή εάν υπάρχουν εστίες και στους δύο λοβούς. Ασθενείς που μπορούν να υποβληθούν σε μια τέτοια εκτομή είναι εκείνοι στους οποίους έχει γίνει θεραπευτική αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και δεν έχει αναγνωρισθεί εξωηπατική νόσος (13).

Απόλυτη αντένδειξη για χειρουργική αντιμετώπιση της μεταστατικής ηπατικής νόσου αποτελεί η παρουσία πολλαπλών εξωηπατικών μεταστάσεων, η ύπαρξη περιτοναϊκής διασποράς της νεοπλασματικής νόσου και η αδυναμία ριζικής ηπατεκτομής (υπολειμματικό ηπατικό παρέγχυμα με λειτουργικότητα < 30%). Σχετική αντένδειξη είναι η παρουσία μιας δυναμικά εξαιρεσίμης εξωηπατικής μεταστατικής εστίας, η σύγχρονη υποτροπή της πρωτοπαθούς εστίας και η παρουσία περιπυλαίων λεμφαδένων.

Παλαιότερα κριτήρια, όπως ο αριθμός (< ή > 4 εστίες) ή το μέγεθος των ηπατικών μεταστάσεων και ο αριθμός των προσβεβλημένων λοβών δεν αποτελούν πλέον αντενδείξεις για χειρουργική εξαίρεση στη σύγχρονη χειρουργική Ογκολογία, η οποία με την εξέλιξη των τεχνικών της έχει πετύχει μεταστεκτομές με χαμηλή θνητότητα (\approx 5%) και αύξηση της πενταετούς επιβίωσης στο 30% των ασθενών.

Η χορήγηση προεγχειρητικής χημειοθεραπείας στοχεύει στην υποσταδιοποίηση ανεγχείρητων βλαβών και στον έλεγχο πιθανής παρουσίας εξωηπατικής νόσου. Ως κριτήρια χορήγησης προεγχειρητικής χημειοθεραπείας χρησιμοποιούνται οι κύριοι παράγοντες υποτροπής (πχ μέγεθος όγκου, παρουσία ή όχι εξωηπατικής νόσου κλπ). Ως σχήματα προεγχειρητικής χημειοθεραπείας έχουν μελετηθεί τόσο το FOLFOX όσο και το FOLFIRI, χωρίς σαφή υπεροχή του ενός έναντι του άλλου και με ποσοστά εξαιρεσιμότητας ηπατικών μεταστάσεων 16% περίπου. Η εκτεταμένη χορήγηση προεγχειρητικής χημειοθεραπείας επέφερε και δυσμενείς επιπτώσεις, όπως η εμφάνιση νέων μορφών τοξικότητας για το ηπατικό παρέγχυμα, πχ ηπατική στεάτωση – στεατοηπατίτιδα και απόφραξη κολποειδών, που αφορούν κυρίως τη χρήση ιρινοτεκάνης και οξαλιπλατίνης αντίστοιχα.

Άλλη μέθοδος προεγχειρητικής αντιμετώπισης είναι ο εμβολισμός της πυλαίας φλέβας που συνοδεύεται από υπερτροφία του υπολοίπου ηπατικού παρεγχύματος, ο οποίος προσφέρει τη δυνατότητα χειρουργικής αντιμετώπισης ασθενών με μείωση των ποσοστών ηπατικής ανεπάρκειας μετά από αφαίρεση μεγάλων ή πολλαπλών ηπατικών εστιών.

Η ηπατεκτομή σε δύο στάδια δίνει τη δυνατότητα αφαίρεσης των μεγαλύτερων εστιών σε α' χρόνο και την εξαίρεση των υπολοίπων σε δεύτερο, με στόχο τη διατήρηση ικανού τμήματος λειτουργικού ηπατικού παρεγχύματος. Ο συνδυασμός αυτής της μεθόδου με τις δύο προηγούμενες έδωσε ποσοστά συνολικής επιβίωσης των ασθενών 70% και 54% σε πρόσφατη μελέτη τον πρώτο και τρίτο χρόνο αντιμετώπισής τους αντίστοιχα. Δυστυχώς αρκετοί ασθενείς θα υποτροπιάσουν, και στο ένα τρίτο αυτών θα υπάρχει μία μόνο εστία υποτροπής. Η χειρουργική εκτομή μπορεί πάντως να επαναληφθεί και αναφέρεται πενταετής επιβίωση 32% περίπου μετά από 3 μεταστεκτομές.

Η χημειοθεραπευτική στρατηγική της μεταστατικής ηπατικής νόσου βασίστηκε για περισσότερα από 50 χρόνια στη χορήγηση 5-FU. Η βιοτροποποίηση αυτής με τη λευκοβορίνη, σε ενδοφλέβια bolus ή παρατεταμένη συνδυαστική χορήγηση, έδωσε σχετική ανταπόκριση \approx 14% - 22% και συνολική επιβίωση 11 – 12 μήνες. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η από του στόματος χορήγηση καπεσιταβίνης, με μικρότερο, όμως, κόστος θεραπείας και απλούστερο τρόπο χορήγησης. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, η προσθήκη οξαλιπλατίνης ή ιρινοτεκάνης άλλαξε ριζικά το θεραπευτικό

τοπίο. Το σχήμα FOLFOX (με βάση την οξαλιπλατίνη) έδωσε ανταποκρίσεις 50,7% - 53% και συνολική επιβίωση 16,2 – 19,4 μήνες, ενώ το FOLFIRI(με βάση την ιρινοτεκάνη) είχε ανταποκρίσεις 31% - 62% και συνολική επιβίωση 14 - 20,1 μήνες. Σήμερα η πλειοψηφία των Ευρωπαίων και Αμερικανών Ογκολόγων προτιμά ως αρχική θεραπεία το FOLFOX και σα δεύτερη γραμμή το FOLFIRI ή την αντικατάσταση της 5-FU με καπεσιταμπίνη (XELODA) ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με ιρινοτεκάνη (XELIRI). Πιθανότητες για καλύτερη επιβίωση έχουν οι ασθενείς που έχουν λάβει θεραπεία και με τους τρεις κυτταροτοξικούς παράγοντες ανεξάρτητα από τη σειρά χορήγησής τους.

Με την είσοδο της μοριακής βιολογίας στην κλινική Ογκολογία, προέκυψαν νέα θεραπευτικά δεδομένα μέσω της επονομαζόμενης στοχευμένης θεραπείας με βιολογικούς παράγοντες (μονοκλωνικά αντισώματα). Οι νέες θεραπείες με τρία μονοκλωνικά αντισώματα (έναντι του VEGF, έναντι του EGFR και το πλήρως εξανθρωπιωμένο Panitumumab) σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία έδειξαν περαιτέρω αύξηση της ανταπόκρισης και της συνολικής επιβίωσης κατά 5 μήνες και έχουν μελετηθεί ως θεραπείες πρώτης ή δεύτερης γραμμής. Τόσο, όμως, το υψηλό κόστος όσο και το θέμα της διάρκειας της χορήγησης αυτών των στοχευμένων θεραπειών που παραμένει σε εκκρεμότητα δημιουργούν προβληματισμό. Θεωρητικά, πάντως, ένας ασθενής με την ύπαρξη όλων των ανωτέρω παραγόντων μπορεί να υποβληθεί σε 7 γραμμές θεραπείας.

Άλλες μέθοδοι αντιμετώπισης των ηπατικών μεταστάσεων είναι η χρήση ραδιοσυχνότητας (RFA) και η έγχυση κυτταροτοξικών παραγόντων μέσω της ηπατικής αρτηρίας, με ταυτόχρονο εμβολισμό ή όχι αυτής (68).

15. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΠΕ – ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Οι ασθενείς, μετά από ολική – ενδοσκοπική ή χειρουργική - αφαίρεση πολυπόδων ή ΚΠΕ, θα πρέπει να τεθούν σε ένα πρόγραμμα επιτήρησης το οποίο διέπεται από συγκεκριμένα χρονοδιαγράμματα εφαρμογής περιοδικών ελέγχων. Οι συστάσεις για την επιτήρηση αυτών των ασθενών (με αρχική κολοσκόπηση με επαρκή προετοιμασία και ολοκλήρωση έως το τυφλό) συνοψίζονται ως εξής:

15Α) ΑΔΕΝΩΜΑΤΩΔΕΙΣ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

ο κίνδυνος ανάπτυξης προχωρημένης νεοπλασίας στο παχύ έντερο σε χρονικό διάστημα 5 ετών μετά από μια αρνητική – για παθολογικά ευρήματα – κολοσκόπηση είναι εξαιρετικά μικρός (1,4% - 2,4%) (64). Ως εκ τούτου, οι ασθενείς με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής, δηλαδή με 1 – 2 σωληνώδη αδενώματα μεγέθους < 1cm ή χωρίς οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ, η επαναληπτική κολοσκόπηση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε 5 -10 έτη, ανάλογα με την ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό, τη συννοσηρότητα του ασθενούς και την ολοκλήρωση και ακρίβεια της αρχικής εξέτασης. Ασθενείς σε ομάδες υψηλού κινδύνου (με ≥ 3 σωληνώδη αδενώματα, με σωληνώδες αδένωμα ≥ 1cm, με αδένωμα με λαχνωτή ιστολογία, με αδένωμα με υψηλόβαθμη

δυσπλασία ή με συγγενή α' βαθμού με ΚΠΕ) η επανάληψη ενδοσκοπικού ελέγχου θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε 3 έτη από την πολυποδεκτομή ενώ για τους ασθενείς με > 10 αδενωμάτωσης πολύποδες ενδοσκοπικός επανέλεγχος σε < 3 έτη.

Οι ασθενείς με υπερπλαστικούς πολύποδες δεν απαιτείται να εισέλθουν σε ιδιαίτερο πρόγραμμα επιτήρησης (13).

15B) ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Δύο είναι οι κύριοι στόχοι της επιτήρησης ασθενών με ΚΠΕ: η πρώιμη ανίχνευση υποτροπής του αρχικού πρωτοπαθούς καρκίνου σε στάδιο τέτοιο που να επιτρέπει τη θεραπεία του και η ανεύρεση μετάχρονων εντερικών νεοπλασμάτων (70). Ο κίνδυνος υπότροπής ΚΠΕ μετά από προηγηθείσα χειρουργική εξαίρεση σε ασθενείς με διήθηση του ορογόνου χιτώννα και λεμφαδενική συμμετοχή είναι αυξημένος ενώ η συχνότητα εμφάνισης μετάχρονου ΚΠΕ είναι 1,1% έως 4,7% (13). Πρακτικά, συνήθως, είναι δύσκολο να διαφοροποιηθεί ένας μετάχρονος καρκίνος από ένα μη διεγνωσμένο κατά τον αρχικό έλεγχο (70).

Τα χρονικά διαστήματα καθώς και οι μέθοδοι επιτήρησης για ΚΠΕ μετά από επιτυχή χειρουργική εκτομή αυτού δεν είναι απόλυτα σαφή. Η συμβολή της κολοσκόπησης είναι ουσιαστική στην ανεύρεση και αφαίρεση σύγχρονων ή μετάχρονων αδενωμάτων σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Η λήψη ιστορικού, επίσης, σε συνδυασμό με την αντικειμενική εξέταση και τις μετρήσεις CEA ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα βοηθούν στην ανίχνευση υποτροπής του καρκίνου. Η ευαισθησία πρώιμης ανίχνευσης υποτροπών είναι 61% περίπου με τη χρήση είτε CT ή CEA. Η χρήση ραδιοσημασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι διαφόρων καρκινικών αντιγόνων, συμπεριλαμβανομένου του CEA, παρέχει σημαντική κλινική πληροφόρηση για τη σταδιοποίηση ασθενών προεγχειρητικά κυρίως όμως μετεγχειρητικά για την ανίχνευση υποτροπής της νόσου. Η CT είναι εξαιρετικά χρήσιμη στη διερεύνηση της πυέλου για υποτροπή καρκίνων του ορθοσιγμοειδούς ενώ η CT πυλαιογραφία δίνει είναι εξαιρετικά ακριβής στην ανίχνευση ηπατικών μεταστάσεων προς εκτομή. Η MRI, επίσης, έχει ιδιαίτερη χρησιμότητα στην ακριβή αποσαφήνιση ύπαρξης ηπατικών μεταστάσεων ενώ η διεγχειρητική υπερηχογραφία (IOUS) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μη ψηλαφητών, μικρών και εν τω βάθει ηπατικών μεταστάσεων κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης (13).

Όλοι οι ασθενείς με ΚΠΕ πρέπει να υποβάλλονται προεγχειρητικά σε επισταμένη διερεύνηση του εντέρου, η οποία για μη αποφρακτικούς όγκους γίνεται με κολοσκόπηση και για τους αποφρακτικούς με αξονική κολογραφία με ενδοφλέβια έγχυση σκιαγραφικού ή με βαριούχο υποκλυσμό διπλής σκιαγραφικής αντίθεσης. Στην περίπτωση των αποφρακτικών όγκων, η διερεύνηση για ύπαρξη σύγχρονων καρκίνων θα πρέπει να γίνει με κολοσκόπηση διεγχειρητικά ή 3 έως 6 μήνες μετά την εκτομή.

Οι ασθενείς με χειρουργικά εκτομηθέντα ΚΠΕ θα πρέπει να υποβληθούν σε κολοσκόπηση 1 έτος μετά την εκτομή ή τη διερευνητική κολοσκόπηση για σύγχρονες βλάβες. Στην περίπτωση που η εξέταση στον 1^ο χρόνο είναι αρνητική για παθολογικά ευρήματα, επανάληψη της εξέτασης επιβάλλεται στα 3 έτη, και αν και αυτός ο έλεγχος αποδειχθεί αρνητικός η επόμενη εξέταση θα πρέπει να γίνει στα 5 έτη. Ο περιοδικός έλεγχος μετά τον 1^ο χρόνο, μπορεί να χρειαστεί να πραγματοποιηθεί σε συντομότερα

χρονικά διαστήματα εάν πρόκειται για ασθενείς με HNPCC ή με ευρήματα αδενωμάτων που χρήζουν τακτικότερου ελέγχου. Στις περιπτώσεις ασθενών με χαμηλή προσθία εκτομή μετά από καρκίνο του ορθού, τα μεσοδιαστήματα ενδοσκοπικού ελέγχου θα πρέπει να είναι ανά 3 – 6 μήνες για τα 2 έως 3 πρώτα χρόνια (αυτά τα μεσοδιαστήματα είναι άσχετα με τα αντίστοιχα των κολοσκοπήσεων για μετάχρονη νόσο).

Διακοπή προγράμματος επιτήρησης μπορεί να γίνει σε ασθενείς με προχωρημένη ηλικία ή συννοσηρότητες (με < 10 έτη προσδόκιμο επιβίωσης). Επίσης, τα προγράμματα επιτήρησης αφορούν ασυμπτωματικούς ασθενείς • η εμφάνιση νέων συμπτωμάτων χρήζει διαγνωστικού ελέγχου (70).

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ

Οι βιολογικοί δείκτες που υπάρχουν μέχρι σήμερα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν είναι επαρκείς. Η ανάγκη για ανεύρεση νέων δεικτών οδήγησε στη μελέτη της πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης 1 τόσο στον καρκίνο του παχέος εντέρου όσο και σε παθολογικές καταστάσεις του εντέρου που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΚΠΕ.

Οι πρωτεΐνες είναι σημαντικά βιολογικά μόρια των οποίων η λειτουργικότητα εξαρτάται πολύ συχνά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των 20 αμινοξικών τους καταλοίπων. Ορισμένες από αυτές τις τροποποιήσεις μπορεί να είναι αντιστρεπτές, όπως η φωσφορυλίωση, ενώ κάποιες άλλες φαίνεται να είναι μη αντιστρεπτές. Οι μη αντιστρεπτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι δυνατό να δημιουργήσουν νέα είδη αμινοξέων προκειμένου να διευρύνουν τη χημική ποικιλομορφία των πολυπεπτιδίων. Σε αυτή την τελευταία ομάδα τροποποιήσεων ανήκουν οι αντιδράσεις μεθυλίωσης (71). Η μεθυλίωση πρωτεϊνών αφορά τη μεταφορά μεθυλικών ομάδων από το μόριο της S-αδενοσυλμεθειονίνη σε ομάδες-δέκτες πάνω στα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Οι διάφορες πρωτεΐνες μπορούν να μεθυλιωθούν σε κατάλοιπα αργινίνης, λυσίνης, ιστιδίνης ή ακόμα και σε καρβοξυλικά κατάλοιπα (72). Επιπλέον, όταν κάποια κατάλοιπα ασπαρτικού μετατρέπονται σε ισοασπαρτικό σαν αποτέλεσμα της πρωτεϊνικής γήρανσης, τα κύτταρα χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό μεθυλίωσης για να αντιστρέψουν αυτή τη διαδικασία (73).

Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης είναι μία πολύ βασική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που συναντάται τόσο στις πυρηνικές όσο και στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών εμφανίζεται στα περισσότερα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (74), καθώς και σε κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως το τρυπανόσωμα (75,76). Μέχρι τις μέρες μας, όμως, δεν έχει βρεθεί σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Η μεθυλίωση καταλοίπων της αργινίνης καταλύεται από την οικογένεια των πρωτεϊνικών N-μεθυλοτρανσφερασών της αργινίνης (PRMTs). Οι πρωτεΐνες που μεθυλιώνονται στην αργινίνη συμμετέχουν σε πολυάριθμες διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση της μεταγραφής, ο μεταβολισμός του RNA και ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA (77). Οι περισσότερες PRMTs μεθυλιώνουν τα υποστρώματά τους σε περιοχές πλούσιες σε γλυκίνη και αργινίνη. Η πολυπλοκότητα της μεθυλαργινίνης ενισχύεται από την ικανότητα αυτού του υπολείμματος να μεθυλιώνεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους στην ομάδα της γουανιδίνης. Η μεθυλίωση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ένα είτε και στα δυο τελικά άτομα αζώτου της γουανιδίνης, δίνοντας τρία πιθανά προϊόντα: 1) μονομεθυλαργινίνη (MMA), 2) N^G,N^G-διμεθυλαργινίνη, στην οποία και οι δυο μεθυλικές ομάδες βρίσκονται στο ίδιο άτομο αζώτου (ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη) (SDMA) και 3) N^G,N^G'-διμεθυλαργινίνη, στην οποία κάθε άτομο αζώτου λαμβάνει μια μεθυλική ομάδα (συμμετρική διμεθυλαργινίνη) (ADMA) (72,78).

Το καθένα από αυτά τα προϊόντα μπορεί να έχει πιθανότατα διαφορετική λειτουργικότητα.

Οι PRMTs κατατάσσονται ως ένζυμα τύπου I, τύπου II, τύπου III και τύπου IV. Τα ένζυμα τύπου I, II και III μεθυλιώνουν το τελικό άτομο αζώτου της γουανιδίνης. Τα ένζυμα τύπου I {PRMT1, PRMT3, CARM1(PRMT4) και PRMT6} καταλύουν το σχηματισμό της N^G - μονομεθυλαργινίνης (MMA), καθώς και των ασύμμετρων καταλοίπων N^G, N^G - διμεθυλαργινίνης (SDMA). Τα ένζυμα τύπου II (PRMT5 και PRMT7) καταλύουν επίσης το σχηματισμό της N^G - μονομεθυλαργινίνης (MMA), αλλά και των συμμετρικών καταλοίπων N^G, N^G - διμεθυλαργινίνης (ADMA). Τέλος, το ένζυμο τύπου III (PRMT7) καταλύει τη μονομεθυλίωση του εσωτερικού ατόμου αζώτου της γουανιδίνης προς σχηματισμό του καταλοίπου $\omega-N^G$ - μονομεθυλαργινίνης (79,80). Η ακριβής σημασία της συμμετρικής ή ασύμμετρης μεθυλίωσης της αργινίνης, όσον αφορά την κυτταρική λειτουργία, είναι ένα ακόμα ερώτημα που πρέπει να διευκρινιστεί. Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι το μεταβολικό κόστος της διαδικασίας μεθυλίωσης είναι υψηλό (η καθαρή ενέργεια που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό ενός μεθυλιωμένου παραγώγου αγγίζει τα 12 ATP) κι επομένως το πλεονέκτημα που προσφέρει αυτή η αντίδραση θα πρέπει να ξεπεράσει το ενεργειακό της κόστος, ώστε να καταφέρνει να διατηρείται μέσα από τις εξελικτικές διαδικασίες.

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 10 PRMTs σε ιστούς θηλαστικών, οι οποίες είναι οι εξής: PRMT1 (HRMT1L2) (81), PRMT2 (HRMT1L1) (82), PRMT3 (83), CARM1 (PRMT4) (84), JBP1 (PRMT5) (85), PRMT6 (86), PRMT7 (87), PRMT8 (88) και PRMT9, FBXO11 (89).

Οι PRMTs είναι τα πιο συχνά εκφραζόμενα ένζυμα και μπορούν να επιτύχουν ένα βαθμό ιστοσυμβατότητας μέσω εναλλακτικού ματίσματος (90). Λίγα δεδομένα είναι μέχρι τώρα γνωστά για τη ρύθμιση της έκφρασης ή της σταθερότητας των PRMTs. Πειράματα αποσιώπησης των γονιδίων PRMT1 και CARM1 (PRMT4) έδειξαν ότι τα ένζυμα αυτά είναι ζωτικά για την επιβίωση. Τα έμβρυα με έλλειψη του PRMT1 πεθαίνουν την εμβρυϊκή μέρα 6,5, και τα έμβρυα με έλλειψη του CARM1 πεθαίνουν κατά τη γέννηση (91,92). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η PRMT1 και η CARM1 έχουν διακριτές, μη επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Επιπλέον, τα CARM1^{-/-} ζώα παρουσιάζουν ελαττωματική ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων σε πρώιμα στάδια (93). Οι PRMTs εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, η PRMT6 μεθυλιώνει την ουρά της ιστόνης H3 και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Η αποσιώπηση της έκφρασης της PRMT6 οδηγεί σε αύξηση των κυττάρων που βρίσκονται στον G2 σημείο ελέγχου. Η απώλεια της PRMT6 έχει σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση της p21 και p27, δύο μέλη της CIP/KIP οικογένειας των CDK (cyclin-dependent kinase). Η ανάλυση της έκφρασης και του υποκινητή δείχνουν ότι η p21 και p27 είναι άμεσοι στόχοι της PRMT6, η οποία μεθυλιώνει την αργινίνη 2 της ιστόνης H3. Επομένως, η PRMT6 συμμετέχει στη μεθυλίωση της αργινίνης των ιστονών ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο (94).

1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συμβάλλουν στην δημιουργία μεγαλύτερης ποικιλότητας στις βιολογικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών. Έχει γίνει σαφές, τα

τελευταία χρόνια, ότι οι μεθυλομάδες μαζί με τις φωσφορικές ομάδες είναι ρυθμιστικά στοιχεία της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών. Η μεθυλίωση των πλευρικών ομάδων των αμινοξικών καταλοίπων και των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών άκρων των πρωτεϊνών δημιουργεί διακριτές χημικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα ρυθμιστικών μονοπατιών (95).

Η τροποποίηση της αργινίνης στην ομάδα της γουανιδίνης είναι η πιο κοινή μεθυλίωση πρωτεϊνών στα θηλαστικά (96,97). Η αργινίνη κατέχει μοναδική θέση ανάμεσα στα αμινοξέα καθώς η ομάδα της γουανιδίνης έχει πέντε πιθανούς δότες υδρογονικών δεσμών. Στα σύμπλοκα πρωτεϊνών-DNA, τα κατάλοιπα αργινίνης είναι οι πιο συχνοί δότες υδρογονικών δεσμών στις φωσφορικές ομάδες και στις βάσεις θυμίνης, αδενίνης και γουανίνης (98). Υδρογονικοί δεσμοί μπορούν να σχηματιστούν μεταξύ καταλοίπων αργινίνης και φωσφορικών ομάδων σε θηλιές RNA (99) και η αλληλεπίδραση αυτή είναι ιδιαίτερα σταθερή στις πρωτεΐνες (100). Η προσθήκη της μεθυλομάδας στα κατάλοιπα αργινίνης όχι μόνο αλλάζει το σχήμα της, αλλά και αφαιρεί ένα πιθανό δότη υδρογονικών δεσμών. Η μεθυλίωση κάποιων αλλά όχι όλων των προσδετών (binding partner) μπορεί να προωθήσει την επιλεκτική καταστολή. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση της αργινίνης της Sam68 σε μοτίβα πλούσια σε προλίνη, μπορεί να αναστείλει την πρόσδεσή της στην ομάδα -SH3, αλλά όχι στις WW περιοχές (πρωτεϊνικές περιοχές που περιέχουν δύο υψηλά συντηρημένες τρυπτοφάνες) (101). Η μεθυλίωση των καταλοίπων αργινίνης μπορεί επίσης να αυξήσει την συγγένεια της σε αρωματικούς δακτυλίους σε κατιόντος-π αλληλεπιδράσεις (102). Τέτοιες αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται στην αρωματική θηλιά της Tudor περιοχής της SMN (motor neurons protein) που πιθανότατα αλληλεπιδρά με τη μεθυλιωμένη ουρά του SmD παράγοντα ματίσματος (103). Έτσι, η τροποποίηση των καταλοίπων αργινίνης στις πρωτεΐνες μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις σύνδεσής τους και με αυτό τον τρόπο να ρυθμίζονται οι φυσιολογικές λειτουργίες τους.

α) Ρόλος της μεθυλίωσης στην επεξεργασία των RNAs

Η πλειονότητα των υποστρωμάτων των PRMTs είναι τα RNAs (104). Έτσι, η μεθυλίωση της αργινίνης έχει συνδεθεί με όλες τις πτυχές του μεταβολισμού των RNAs, περιλαμβανομένης της μεταγραφής, του ματίσματος, της μεταγωγής, της μετάφρασης και της ανακύκλωσης (turnover).

Οι RBPs (RNA binding proteins) συμμετέχουν στην σταθερότητα, στον εντοπισμό των RNAs και στην μετάφραση του mRNA. Ένας πολύ γνωστός στόχος των PRMTs είναι οι RBPs, καθώς οι περισσότερες hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins – ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες) έχουν GAR μοτίβα (μοτίβα πλούσια σε γλυκίνη αργινίνη). Έχει προταθεί ότι η μεθυλίωση της αργινίνης συμβάλλει στην ωρίμανση (105), καθώς, αρκετές RBPs περιλαμβανομένης της Sam68, εντοπίζονται υπερμεθυλιωμένες (106,107). Επιπλέον, η μεθυλίωση των RBPs ρυθμίζει τη συμμετοχή τους στην ωρίμανση των μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (snRNPs) (108,109). Έχει δειχθεί ότι η αποτελεσματικότητα του ματίσματος μειώνεται σε υπερμεθυλιωμένα εκχυλίσματα πυρήνων. Η CARM1 έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει ως ρυθμιστής στο εναλλακτικό μάτισμα (110,111). Η CARM1 μεθυλιώνει τους παράγοντες

ματίσματος CA150, SAP49, SmB και U1C. Η μεθυλίωση του CA150 δημιουργεί ένα μοτίβο που μπλοκάρει την Tudor περιοχή της SMN.

Η μεθυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S2 είναι μια συντηρημένη διαδικασία από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο και επηρεάζει τη βιοσύνθεση του (112,113). Ωστόσο, ο λειτουργικός ρόλος της μεθυλίωσης των πρωτεϊνών που συνδέονται στην πολύ(A) ουρά (PABP – poly(A) binding protein) δεν έχει ακόμα αποδειχθεί (114,115). Η δευτεροταγής και τριτοταγής δομή του RNA αποκαλύπτει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από τις RBPs (116). Οι αργινίνες στο ενεργό κέντρο των RBPs είναι αμινοξέα με ρόλο κλειδί στις αλληλεπιδράσεις του RNA με τις πρωτεΐνες (117). Η συγγένεια μεταξύ της RBP και του RNA μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας.

Εναλλακτικά, η μεθυλίωση της αργινίνης μπορεί να ρυθμίσει θετικά τις αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεϊνών. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα αν η μεθυλίωση της αργινίνης επηρεάζει δραματικά την ειδική σύνδεση των RBPs στο RNA.

β) Ο ρόλος της μεθυλίωσης στη ρύθμιση της μεταγραφής

Οι PRMTs μπορούν να μεθυλιώσουν και να ρυθμίσουν μεταγραφικούς παράγοντες, συνενεργοποιητές, και ιστόνες. Οι ιστόνες αποτελούν από τους πρώτους στόχους των μεθυλοτρανσφερασών που βρέθηκαν (118), και είναι γνωστό ότι οι ιστόνες είναι στόχοι των PRMT1, CARM1, και PRMT5 (119,120). Οι ιστόνες υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (121). Μέχρι στιγμής, έχουν βρεθεί αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο p53 (122), ο YY1 (123), ο NF-κB (124), ο PPARγ (125), και ο RUNX1 (126) που στρατολογούν τις PRMTs στους υποκινητές. Επίσης, οι PRMTs μεθυλιώνουν συνενεργοποιητές, όπως ο CBP/p300 (127), όπως επίσης και τους παράγοντες επιμήκυνσης της μεταγραφής SPT5 (128), HIVTat (129), και hnRNPs για να προάγουν το πακετάρισμα των mRNPs (130,131). Με αυτό τον τρόπο, η μεθυλίωση της αργινίνης ρυθμίζει την έναρξη και την επιμήκυνση της μεταγραφής και πιθανώς συγχρονίζει το πακετάρισμα των mRNP. Η PRMT1 και η CARM1 φαίνεται ότι λειτουργούν ως γενικοί μεταγραφικοί συνενεργοποιητές, παρόμοια με τον p300/CBP. Οι PRMTs μπορούν να παίξουν και το ρόλο μεταγραφικού καταστολέα, όπως, για παράδειγμα, η PRMT5 που δρα με ένα μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων και κατασταλτικών συμπλόκων, όπως ο BRG1 (132), Blimp1 (133) και SNAIL (134). Η PRMT5, όταν στρατολογηθεί στον υποκινητή, τοποθετεί μεθυλομάδες, οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν σημάδια έναρξης της μεταγραφής (135). Η μεθυλιωμένη αργινίνη στις ουρές των ιστονών μπορούν να αναγνωριστούν μαζί με άλλα ενεργοποιητικά σημάδια. (136) Μία ακόμα μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης που μεθυλιώνει ιστόνες και έχει κατασταλτική δράση είναι η PRMT6 (137).

Οι πρωτεΐνες HMGs (πρωτεΐνες υψηλής κινητικότητας) είναι ρυθμιστές της δομής της χρωματίνης και της μεταγραφής. Μια υποοικογένεια των HMGs, οι πρωτεΐνες HMGA, περιέχει 3 μοτίβα με τα οποία συνδέονται στο DNA και σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Τα μοτίβα αυτά της HMGA1 έχουν RG αλληλουχίες που έχουν μεθυλιωμένη την αργινίνη (138). Ο βαθμός και οι θέσεις της μεθυλίωσης μέσα στα μοτίβα ποικίλουν από κυτταρική σε κυτταρική σειρά. Έχει προταθεί, αλλά δεν έχει ακόμα αποδειχθεί, ότι η μεθυλίωση των μοτίβων αυτών ίσως ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-DNA ή πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Τέλος, η PRMT7 έχει ρόλο κλειδί στη μεθυλίωση του DNA στο ICR (imprint control region) (139). Η PRMT7 αλληλεπιδρά και σχηματίζει σύμπλοκο με τη CTCFL, και το σύμπλοκο αυτό μεθυλιώνει την ιστόνη H4. Με αυτό τον τρόπο, διευκολύνεται η πρόσδεση των DNA μεθυλοτρανσφερασών Dnmt3a και Dnmt3b.

γ) Ο ρόλος της μεθυλίωσης στη μεταγωγή σήματος

Η μεταγωγή σήματος ελέγχεται από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που αλλάζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών, τροποποιώντας εν μέρει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η μεθυλίωση της αργινίνης φαίνεται να μπλοκάρει ορισμένες αλληλεπιδράσεις και προάγει κάποιες άλλες (140). Οι αλληλεπιδράσεις που ρυθμίζονται από τις SH3 περιοχές είναι ευαίσθητες στη μεθυλίωση της αργινίνης, ενώ οι αλληλεπιδράσεις των WW και Tudor περιοχών δεν επηρεάζονται ή ενισχύονται από τη μεθυλίωση της αργινίνης (141,142,143). Υπάρχουν αρκετά μονοπάτια που χρησιμοποιούν τη μεθυλίωση της αργινίνης ως σήμα για την έναρξη της μεταγωγής σήματος καθοδικά του υποδοχέα της ιντερφερόνης, του υποδοχέα των T κυττάρων, των υποδοχέων των κυτταροκινών, και του υποδοχέα του NGF (nerve growth factor). Η PRMT1 είναι το πρώτο ένζυμο που συνδέθηκε με τη μεταγωγή σήματος, για την οποία έχει βρεθεί πως συνδέεται στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα της ιντερφερόνης τύπου I (144). Σε αυτή την περίπτωση, η ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης είναι ένα θετικό σήμα στην καθοδικά-ρυθμιζόμενη (antisense-mediated) μείωση των επιπέδων της PRMT1, που προκαλεί αντίσταση στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης από την ιντερφερόνη. Ο NGF φαίνεται να ενεργοποιεί δράση όμοια με της PRMT1, χωρίς όμως ο μηχανισμός να είναι γνωστός (145). Επίσης, το NF-AT μονοπάτι είναι στόχος της PRMT1. Η μεθυλίωση της αργινίνης διευκολύνει την αλληλεπίδραση του NIP45 με το NF-AT και διεγείρει τη γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών (146). Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά είναι αμφιλεγόμενα (147).

Κάποια μετέπειτα δεδομένα έδειξαν ότι η καλλιέργεια κυττάρων παρουσία ινσουλίνης προάγει τη συσσώρευση της PRMT1 στο μεμβρανικό εκχύλισμα (148). Έτσι, παρέχεται μια πρώτη ένδειξη ότι η μεθυλίωση της αργινίνης ίσως συμμετέχει στη σηματοδότηση της ινσουλίνης και στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Επιπλέον, η PRMT1 παίζει ένα ρόλο στο μη γενωμικό σηματοδοτικό μονοπάτι των οιστρογόνων (149). Σε αυτή τη διαδικασία, ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER) σχηματίζει ένα κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο ενεργοποιεί ένα μεγάλο αριθμό καθοδικών μορίων σηματοδότησης, περιλαμβανομένων των PKC, ras, Akt και MAPK. Η σύνδεση οιστρογόνων-ER πυροδοτεί την άμεση μεθυλίωση του υποδοχέα από την PRMT1, η οποία με τη σειρά της διευκολύνει τη σύνδεση του ER με το Src, FAK και p85. Με αυτό τον τρόπο, η PRMT1 προάγει το σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταγωγής σήματος και ενός συμπλόκου επιγενετικής ρύθμισης. Ένας άλλος τρόπος που μπορεί να δρα η μεθυλίωση της αργινίνης είναι η αναστολή της φωσφορυλίωσης από την Akt. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση του FOXO1 από την PRMT1 αναστέλλει τη φωσφορυλίωσή του από την Akt και προάγει τον πυρηνικό εντοπισμό αυτού του μεταγραφικού παράγοντα (150).

Η PRMT8 θα μπορούσε επίσης να επηρεάζει ένα σηματοδοτικό μονοπάτι (151). Η PRMT8 φέρει περιοχές πλούσιες σε προλίνη, οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούμε με τις SH3 περιοχές, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως κομβικό σημείο σηματοδότησης (152).

δ) Ο ρόλος της μεθυλίωσης στην επιδιόρθωση του DNA

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η διπλή θραύση του DNA (DSBs) επιδιορθώνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό (HRR) ή με τη σύνδεση μη ομόλογων άκρων (NHEJ). Το σύμπλοκο MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) παίζει καθοριστικό ρόλο στο HRR, ενώ έχει βρεθεί ότι μεθυλιώνεται (153). Η πρωτεΐνη MRE11 είναι η μόνη πρωτεΐνη του συμπλόκου που φέρει GAR μοτίβο, το οποίο μεθυλιώνεται από την PRMT1 (154). Φαίνεται πως η μεθυλίωση της MRE11 επηρεάζει τη δράση της ως εξωνουκλεάση, καθώς η αναστολή της μεθυλίωσης εμποδίζει τη στρατολόγηση της MRE11 στο σημείο των DSBs (155). Η 53BP1 συμμετέχει επίσης στη DSB επιδιόρθωση. Η 53BP1 φέρει GAR μοτίβα, τα οποία μεθυλιώνονται από την PRMT1 (156). Η DNA πολυμεράση β (Pol-β) εμπλέκεται στην επιδιόρθωση των αλλαγών των βάσεων. Η πολυμεράση-β μεθυλιώνεται από την PRMT6 και την PRMT1 στις θέσεις με ενεργότητα νουκλεοτιδιο-τρανσφεράσης (157)(158). Η PRMT6 μεθυλιώνει την πολυμεράση-β στην R83 και R152 και αυξάνει την ενεργότητα της πολυμεράσης ενισχύοντας τη σύνδεσή της στο DNA και τη λειτουργικότητά της (158). Η PRMT1 μεθυλιώνει την R137, μπλοκάροντας την αλληλεπίδραση της πολυμεράσης-β και του PCNA (157). Μέχρι τώρα, δεν έχουν βρεθεί στοιχεία για τη μεταβολή των επιπέδων της μεθυλίωσης της αργινίνης όταν παρουσιάζονται λάθη στο DNA.

ε) Οι μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης στον καρκίνο

Οι αρχικές μελέτες που συνέδεαν τις PRMTs με τον καρκίνο ήταν περιστασιακές, αλλά τα τελευταία χρόνια επιτεύχθηκε μια καλύτερη κατανόηση του πως οι PRMTs μπορούν να επηρεάσουν τα κύτταρα. Οι PRMTs είναι γνωστοί συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων, γεγονός που τις καθιστά πιθανές πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται σε διάφορους καρκινικούς τύπους. Τόσο η PRMT1 όσο και η CARM1 είναι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές, και ως εκ τούτου, η μη φυσιολογική έκφρασή τους ή η αλλαγμένη ρύθμισή τους ενδέχεται να επηρεάζει πολλά μεταγραφικά μονοπάτια. Τα επίπεδα του mRNA του PRMT1 έχουν βρεθεί να αυξάνονται σε ένα πάνελ κυτταρικών σειρών του καρκίνου του μαστού σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες (159). Τα πρώτα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η PRMT1 παίζει ρόλο στην ογκογένεση προήλθαν από μελέτες σε πρωτογενή αιμοποιητικά κύτταρα ποντικού που διαμολύνθηκαν με το χιμαιρικό γονίδιο MLL-EEN, το οποίο αυξάνει την ικανότητα αυτοανανέωσης. Το τμήμα του EEN το οποίο είναι συγχωνευμένο με το MLL φιλοξενεί μία SH3 περιοχή που μπορεί να δεσμεύσει την SAM68. Η SAM68 είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο υπόστρωμα της PRMT1. Όταν είτε η SAM68 ή η PRMT1 συντήκονται απευθείας με το MLL στη θέση του EEN, οι συγχωνεύσεις αυτές μπορούν, επίσης, να ενεργοποιήσουν τις ογκογονικές ιδιότητες του MLL, γεγονός που συνεπάγεται ότι η μεθυλιωμένη SAM68 είναι ένα κρίσιμο μόριο εδώ (160). Είναι ενδιαφέρον ότι η CARM1 δεν έχει αυτή την ικανότητα.

Τα επίπεδα της CARM1 είναι αυξημένα στον καρκίνο του προστάτη(161,162), καθώς και σε επιθετικές μορφές του καρκίνου του μαστού που, επίσης, εκφράζουν υψηλά επίπεδα του ογκογόνου συνενεργοποιητή AIB1 (163). Η CARM1 μεθυλιώνει τον AIB1, ρυθμίζοντας έτσι τη δραστηριότητα και τη σταθερότητα του (164,165). Η πρόσδεση της CARM1 στο ERα-ρυθμιζόμενο υποκινητή βασίζεται στην παρουσία του AIB1, και η CARM1 είναι απαραίτητη για τον οιστρογόνο-επαγόμενο πολλαπλασιασμό της MCF-7 καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού(166).

Η κανονική αναπτυξιακή διαδικασία της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου. Ως συνέπεια της EMT, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν και να εισχωρήσουν πολύ πιο αποτελεσματικά, και η διαδικασία αυτή διαδραματίζει έναν ενεργό ρόλο στη μεταστατική εξάπλωση ενός όγκου. Ένα χαρακτηριστικό της EMT είναι η απώλεια της έκφρασης της E-cadherin. Η έκφραση της E-cadherin είναι μειώνεται σημαντικά από το μεταγραφικού παράγοντα SNAIL. Μια πρόσφατη έρευνα απέδειξε ότι η PRMT5 αλληλεπιδρά με τον SNAIL μέσω ενός άλλου μορίου (AJUBA)(167). Η καταστολή της PRMT5 με τη χρήση siRNA προκαλεί την αύξηση της έκφρασης της E-cadherin. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η PRMT5 είναι ένας κρίσιμος συγκαταστολέας του SNAIL. Επιπλέον, η υπερέκφραση της PRMT5 προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων (168), υποστηρίζοντας την αντίληψη ότι η PRMT5 μπορούσε να είναι μια ογκοπρωτεΐνη. Με τα παραπάνω ταυτίζονται τα αποτελέσματα που δείχνουν ότι τα επίπεδα της PRMT5 αυξάνονται στο γαστρικό καρκίνο (169) και σε κύτταρα λεμφώματος και λευχαιμίας (170).

Οι E2F μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται άμεσα στις κυτταρικές λειτουργίες. Ο E2F-1 μεθυλιώνεται άμεσα από την PRMT5, και η μεθυλίωση της αργινίνης είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση των βιοχημικών και λειτουργικών ιδιοτήτων του. Η μεθυλίωση επηρεάζει τη E2F-1-ελεγχόμενη ανάπτυξη. Έτσι, η καταστολή του PRMT5 οδηγεί στην αύξηση του E2F-1, που οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη και σχετίζεται με την απόπτωση. Η μεθυλίωση της αργινίνης επηρεάζει τη σταθερότητα του E2F-1, και αυξάνει τη δυνατότητα πρόσδεσης του E2F-1 στο DNA, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η μεταγραφή των γονιδιακών στόχων. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα της PRMT5, το οποίο συμπίπτει με τα χαμηλά επίπεδα του E2F-1 και αντανακλά φτωχή κλινική έκβαση. Συνεπώς, η μεθυλίωση της αργινίνης ρυθμίζει την ενεργότητα του E2F-1 και σχετίζεται με την ογκογένεση επηρεάζοντας το μονοπάτι του E2F (171).

Η μεθυλίωση της αργινίνης έχει συνδεθεί με την παιδιατρική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ). Το SFRS1, το οποίο είναι πρωτο-ογκογονίδιο, υπερεκφράζεται σε ασθενείς με ΟΛΛ. Η PRMT1 μεθυλιώνει το SRSF1 - το οποίο είναι αντιαποπτωτικός παράγοντας - in vitro (172) και φαίνεται πως η μεθυλίωση της αργινίνης ελέγχει τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη λειτουργία του SRSF1(173). Ο Zou et al. (2012), έδειξε ότι η PRMT1 υπερεκφράζεται τόσο σε κλινικά δείγματα ΟΛΛ όσο και σε κυτταρικές σειρές (174). Η PRMT1 φαίνεται πως μεθυλιώνει και το RUNX1, ένα βασικό μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στο 30% των παιδιατρικών λευχαιμιών. Η υπερέκφραση της PRMT1 αυξάνει τα επίπεδα μεθυλίωσης του RUNX1, κι έτσι ρυθμίζεται η διαφοροποίηση μέσω αλλαγής της δομής της χρωματίνης (175). Συνεπώς,

οι πρωτεΐνες αυτές υπόκεινται σε εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και πρωτεΐνης-RNA. Φαίνεται λοιπόν πως η αλληλεπίδραση μεταξύ SRSF1 και PRMT1 μπορεί να έχει ογκονόνο δράση στη λευχαιμογένεση.

Η μεθυλίωση του DNA είναι σημαντική για τη χρωματινική δομή και λειτουργία στα κύτταρα των θηλαστικών. Η γενετική απομάκρυνση ενζύμων που καταλύουν την μεθυλίωση του DNA, καταλήγει σε ατελή γενετική αποτύπωση, στην αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων, στην αντιστάθμιση της δόσης του X χρωμοσώματος και στη γενωμική σταθερότητα. Αυτή η επιγενετική τροποποίηση ερμηνεύεται από τις MBD πρωτεΐνες (πρωτεΐνες που συνδέονται με μεθυλιωμένο DNA). Οι MBD αποκρύβονται στη μεθυλίωση του DNA στρατολογώντας τις HDAC και άλλους παράγοντες καταστολής της μεταγραφής, στη χρωματίνη. Η MBD2 είναι σημαντική για την επιβίωση, αλλά εμπλέκεται στην ανάπτυξη όγκων στο παχύ έντερο. Η λειτουργία της MBD2 ελέγχεται με τη μεθυλίωση της αργινίνης. Οι μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης καταλύουν αυτή την τροποποίηση και η μεθυλίωση της αργινίνης καταστέλλει τη λειτουργία της MBD2. Η μεθυλίωση της αργινίνης μειώνει το σχηματισμό του συμπλόκου MBD2-μεθυλ-DNA και το σχηματισμό του συμπλόκου MBD2-HDAC και μειώνεται η δράση της MBD2 στη μεταγραφική καταστολή. Επομένως, οι μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης συμμετέχουν στο σύστημα μεθυλίωσης του DNA του ελέγχου της χρωματίνης (176).

Μία πρόσφατη εργασία έδειξε ότι η έκφραση των PRMT4(CARM1) και PRMT6 μειώνεται στο μελάνωμα, ενώ η έκφραση των υπόλοιπων PRMTs παραμένει σταθερή. Γενικά, η ενεργότητα των PRMTs και κατ' επέκταση η συμμετρική και ασύμμετρη μεθυλίωση των πρωτεϊνών μειώνονται σημαντικά στα κύτταρα και ιστούς μελανώματος. Αυτό οφείλεται στην απώλεια της έκφρασης της MTAP (methylthioadenosin phosphorylase), και την αύξηση της MTA (5' – methylthioadenosine). Η μείωση της πρωτεϊνικής μεθυλίωσης από τη MTA επηρεάζει τη κυτταρική σηματοδότηση και οδηγεί, για παράδειγμα, στην ενεργοποίηση της ERK (extracellular signal-regulated kinase). Η επίδραση της ενδογενούς MTA στις PRMTs όπως φαίνεται σ' αυτή την εργασία μπορεί να υποστηρίξει την ικανότητα μετανάστευσης και το διεισδυτικό φαινότυπο των κυττάρων του μελανώματος (177).

2. Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1)

Η PRMT1, η κυριότερη μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης θηλαστικών τύπου I, ανακαλύφθηκε από την ομοιότητα που παρουσιάζει με την αλληλουχία της μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης Hmt1/Rmt1 της ζύμης (178). Η PRMT1 είναι υπεύθυνη για το 85% των μεθυλίωσεων αργινίνης σε ορισμένες κυτταρικές καλλιέργειες(179). Εκφράζεται ευρέως και εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα και παρουσιάζει υψηλή κινητικότητα μεταξύ αυτών των διαμερισμάτων (180). Το mRNA του PRMT1 εντοπίζεται σε όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς και ιστούς ενηλίκων, αποδεικνύοντας τη διαδεδομένη σημασία του ενζύμου αυτού στις κυτταρικές λειτουργίες (181). Το PRMT1 γονίδιο αποτελείται από 12 εξώνια (182), από τα οποία προκύπτουν 7 διαφορετικές ισομορφές με εναλλακτικό μάτισμα. Αυτές οι ισομορφές ποικίλουν στην αμινοξυτελική περιοχή και παρουσιάζουν

διαφορετική καταλυτική ενεργότητα και ειδικότητα στα υποστρώματα (183). Οι διαφορετικές ισομορφές μπορεί να εξυπηρετούν στην τροποποίηση της ενεργότητας της PRMT1 σε διάφορους ιστούς, παρέχοντας ένα μηχανισμό ρύθμισης της ενεργότητας της PRMT1. Για τη μελέτη της ενεργότητας της PRMT1 *in vivo*, δημιουργήθηκαν κnockout ποντίκια στα οποία η έκφραση της PRMT1 ήταν μειωμένη περίπου στο 5% συγκριτικά με τα φυσιολογικά επίπεδα (184)(185). Αυτά τα ποντίκια πέθαιναν στην E6,5 ημέρα (Embryonic day 6,5), αποδεικνύοντας ότι η PRMT1 είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης (184). Τα εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα, προερχόμενα από αυτά τα ποντίκια, είναι βιώσιμα παρότι παρουσιάζουν μία σημαντική μείωση της μεθυλίωσης των πρωτεϊνών στην αργινίνη. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η καταστολή της PRMT1 οδηγεί σε υπομεθυλίωση διάφορων πρωτεϊνών, όπως επίσης μειωμένη κυτταρική επιβίωση και σηματοδότηση ως απόκριση σε βλάβες στο DNA (186). Ωστόσο, όταν απουσιάζει η ομόλογη πρωτεΐνη της PRMT1, η Hmt1/Rmt1, στα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*, τα κύτταρα αυτά είναι βιώσιμα, δείχνοντας ότι η PRMT1 δεν είναι απαραίτητη για την κυτταρική επιβίωση στη ζύμη (187)(188). Παρόλ' αυτά, τα κύτταρα ζύμης που παρουσιάζουν έλλειψη της Hmt1/Rmt1, παρουσιάζουν πολλαπλά λάθη, περιλαμβανομένης της λανθασμένης εντόπισης των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο (189) και ανωμαλίες στην αποσιώπηση της χρωματίνης (190).

Η μεθυλίωση από την PRMT1 συμβαίνει κυρίως σε μοτίβα πλούσια σε γλυκίνη και αργινίνη (GAR) (77), ωστόσο, και άλλα πρωτεϊνικά μοτίβα που μπορούν να μεθυλιωθούν έχουν ανακαλυφθεί τα τελευταία χρόνια (191). Η ενεργότητα της PRMT1 μπορεί να ρυθμίζεται με διάφορους τρόπους. Η εντόπισή της ίσως ρυθμίζεται εν μέρει από πρωτεΐνες, όπως ο PXR (pregnane X receptor) που μπορεί να αλλάζει τον εντοπισμό της PRMT1, οδηγώντας στην συσσώρευσή της στον πυρήνα (192). Η ενεργότητα της PRMT1 ρυθμίζεται επίσης από τη σύνδεση με άλλες πρωτεΐνες, όπως ο BTG1 (B-cell translocation gene 1), το TIS2/BTG2 και ο hCAF1 (CCR4-associated factor 1) (178)(193), και εξαρτάται από τον πολυμερισμό (194,195,196). Η BTG1 και BTG2 φαίνεται πως ρυθμίζουν τη λειτουργία της PRMT1 μέσω άμεσης σύνδεσης, αυξάνοντας τη μεθυλίωση που οφείλεται στη PRMT1 (178). Η μείωση της BTG1 οδηγεί σε μείωση των μεθυλιωμένων αργινινών στον πυρήνα, αλλά όχι στο κυτταρόπλασμα (197). Αυτό δείχνει ότι οι ρυθμιστές της λειτουργίας της PRMT1 είναι παρόντες σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

Η PRMT1 έχει πολύ μεγάλη ειδικότητα στο υπόστρωμά της, έχοντας προτίμηση να μεθυλιώνει κατάλοιπα αργινίνης τα οποία πλαισιώνονται από ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλυκίνης (198,199). Μελέτες στη δομή της πρωτεΐνης έδειξαν ότι υπάρχουν τρία διαφορετικά κανάλια σύνδεσης με πεπτίδια, υποδεικνύοντας ότι τα διαφορετικά υποστρώματα της PRMT1 μπορεί να προσεγγίζουν το ενεργό κέντρο από διαφορετικά σημεία (196). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μία νεότερη μελέτη (200). Ο Osborne et al. (2007), έδειξε ότι τα μακρινά κατάλοιπα μπορούν να επηρεάσουν τη μεθυλίωση της αργινίνης (201). Η τρισδιάστατη δομή της PRMT1 δείχνει ότι είναι ενεργή ως ομοδιμερές (196).

Ένα από τα πρώτα υποστρώματα της PRMT1 που βρέθηκαν είναι η ILF3 (interleukin enhancer binding factor 3), η οποία συνδέεται στη PRMT1 (202). Η ILF3 φαίνεται ότι

ρυθμίζει την ενεργότητα της PRMT1 προς άλλα υποστρώματα, δείχνοντας την ύπαρξη μια θηλιάς ανατροφοδότησης (feedback loop) μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών. Η απώλεια του ολιγομερισμού της PRMT1 έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη λειτουργικότητα τόσο ως συνενεργοποιητής όσο και ως μεθυλοτρανσφεράση, παρότι η μονομερής PRMT1 παρουσιάζει υψηλή ικανότητα σύνδεσης με άλλους συνενεργοποιητές, αυξάνοντας τη λειτουργία τους (200). Για παράδειγμα, η σύνδεση της PRMT1 με τον TR3 πυρηνικό υποδοχέα δεν οδηγεί σε μεθυλίωση, αλλά αυξάνει τη σταθερότητα του TR3, προστατεύοντας τον υποδοχέα από την αποικοδόμηση, αυξάνοντας τα επίπεδα της έκφρασής του και της ενεργότητάς του (203). Η παραπάνω μελέτη έδειξε επίσης ότι η σύνδεση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών αναστέλλει την ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης της PRMT1, μειώνοντας τη μεθυλίωση διάφορων καθοδικών υποστρωμάτων. Η ενεργότητα των PRMTs μπορεί να ρυθμίζεται από την φωσφορυλίωση, όπως συμβαίνει με την CARM1 (204).

2A) Τα υποστρώματα της PRMT1

Η PRMT1 έχει μία ποικιλία υποστρωμάτων στο κύτταρο. Ένας κύριος στόχος των PRMTs είναι οι ιστόνες, των οποίων η μεθυλίωση σχετίζεται με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφραση (205). Η PRMT1 μεθυλιώνει την ιστόνη H4 στην αργινίνη 3 (H4P3) (206). Αυτή η τροποποίηση στην ιστόνη H4 λειτουργεί ως σημάδι μεταγραφικής ενεργοποίησης η οποία μπορεί είτε να στρατολογεί τις πρωτεΐνες που συνδέονται σε μεθυλομάδες ή να επηρεάζουν την απόθεση άλλων μεταγραφικών σημαδιών σε γειτνίαση. Στη ζύμη, η Hmt1/Rmt1 συμμετέχει στην αποσιώπηση της χρωματίνης (190), ενώ μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών δείχνουν ότι η PRMT1 έχει κυρίως δράση συνενεργοποιητή (207,208). Ωστόσο, οι μεθυλιωμένες αργινίνες στις ιστόνες είτε σχετίζονται με τη γονιδιακή καταστολή ή με την ενεργοποίηση. Η ακριβής επίπτωση της μεθυλίωσης της αργινίνης εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των μεθυλομάδων με άλλα «σημάδια», τις μεθυλιωμένες, ακετυλιωμένες ή ουμπικουτινωμένες λυσίνες. Η προσθήκη της ADMA στις ιστόνες από την PRMT1 και την CARM1 γενικά εξυπηρετεί ως ενεργοποιητικό σημάδι, ενώ η προσθήκη της SDMA στις ιστόνες από την PRMT5 είναι σημάδι γονιδιακής καταστολής (209). Παρ' όλα αυτά, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η PRMT1 και η CARM1 ίσως εμπλέκονται στη γονιδιακή καταστολή (208). Έτσι, μία από τις λειτουργίες κλειδιά της PRMT1 είναι η ρύθμιση της μεταγραφής, και η σωστή χωροχρονική στόχευση της πρωτεΐνης σε ειδικές περιοχές της χρωματίνης. Ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής, η PRMT1 στρατολογείται στους υποκινητές από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες (77), όπως ο p53 (210), και του YY1 (211). Η μεθυλίωση της αργινίνης της p53 ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση που ελέγχεται από την p53 (212). Η στρατολόγηση της PRMT1 είναι μία δυναμική διαδικασία, όπως η ενεργοποίηση του υποδοχέα της θυρεοτρόπου ορμόνης έχει σαν αποτέλεσμα την παροδική συσχέτιση του PRMT1 με τα στοιχεία απόκρισης στην T3, λειτουργώντας ως συνενεργοποιητής της μεταγραφής. Η σύνδεση με ποικίλους μεταγραφικούς παράγοντες έχει σαν αποτέλεσμα τη ρύθμιση της στρατολόγησης της PRMT1 σε ειδικές γενωμικές περιοχές, οδηγώντας σε αλλαγές του τρόπου μεθυλίωσης των ιστονών και συνεπώς αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση. Η μεθυλίωση της αργινίνης και σε άλλες πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στη μεταγραφή, συμπεριλαμβανομένων

συνενεργοποιητών (213,214), παραγόντων μεταγραφικής επιμήκυνσης (215), και παραγόντων ματίσματος (216,217). Ο TAF15, μία πυρηνική πρωτεΐνη που συνδέεται με RNA και εμπλέκεται στη γονιδιακή ρύθμιση. Μεθυλιώνεται από την PRMT1 και επηρεάζεται τόσο ο υποκυτταρικός εντοπισμός του όσο και η ενεργότητά (218). Η μεθυλίωση του παράγοντα μεταγραφικής επιμήκυνσης SPT5 από την PRMT1 ρυθμίζει τόσο τη σύνδεσή του με τον υποκινητή όσο και την αλληλεπίδρασή του με την RNA πολυμεράση II (215), ενώ η μεθυλίωση του FOXO1 μπλοκάρει την AKT-ρυθμιζόμενη φωσφορυλίωση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα, οδηγώντας στην έξοδό του από τον πυρήνα και την αποικοδόμησή του (219). Η μεθυλίωση της αργινίνης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει την ενεργότητά τους και έτσι η PRMT1 εμπλέκεται σε πολλαπλά επίπεδα στην έκφραση διαφορετικών γονιδίων. Η PRMT1 έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και αλλάζει τον κυτταρικό εντοπισμό των υποστρωμάτων της (77,220,221). Για παράδειγμα, η Sam68 περιέχει περιοχές πλούσιες σε προλίνη που αλληλεπιδρούν με τις SH3 και WW περιοχές διαφόρων πρωτεϊνών (222). Αυτές οι περιοχές πλούσιες σε προλίνη βρίσκονται πλησίον RG επαναλήψεων, οι οποίες έχει βρεθεί ότι μεθυλιώνονται από την PRMT1 (223,224). Η μεθυλίωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη σύνδεση στις SH3, αλλά όχι στις WW, περιοχές, επιτρέποντας τη ρύθμιση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (224). Η PRMT1 προσθέτει μεθυλομάδες στην Arg296 και Arg299 της hnRNP K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K), οι οποίες είναι πλησίον στην SH3-συνδεόμενη περιοχή της πρωτεΐνης. Η μεθυλίωση της hnRNP k μπορεί να αλλάζει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της, κυρίως με τις πρωτεΐνες της Src οικογένειας (225,226). Έχει βρεθεί επίσης ότι η επιβίωση της SMN (motor neurons protein), η οποία συμμετέχει στη συναρμολόγηση των snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins), παρουσιάζει ισχυρή σύνδεση με τις snRNP πρωτεΐνες SmD1 και SmD3 όταν αυτή φέρει SDMA (227). Η SMN περιέχει μία Tudor περιοχή, η οποία ρυθμίζει την αλληλεπίδρασή της με τις Sm πρωτεΐνες (228). Η σύνδεση των Tudor περιοχών στη SDMA των RG περιοχών περιγράφηκε αργότερα στον SPF30 (splicing factor 30kDa) και στις TDRD3 (Tudor domain-containing 3) πρωτεΐνες (229). Με αυτό τον τρόπο, η μεθυλίωση της αργινίνης φαίνεται να παίζει ρόλο στον καθορισμό των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω διάφορων περιοχών.

Οι αργινίνες είναι παρούσες σε περιοχές σύνδεσης σε νουκλεϊκά οξέα και έχουν το δυναμικό να αλλάζουν τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις και το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών (230). Η προσθήκη μιας μεθυλομάδας μπορεί να εμποδίσει το σχηματισμό ενός υδρογονικού δεσμού, ή μπορεί να ενισχύσει τις van der Waals αλληλεπιδράσεις λόγω της υψηλής υδροφοβικότητας της αργινίνης (77). Υπάρχουν επίσης ορισμένα παραδείγματα, όπου η μεθυλίωση επηρεάζει την αλληλεπίδραση με το RNA. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση της Sam68 από τη PRMT1 μειώνει την ικανότητα της Sam68 να συνδεθεί στις πολύ-U αλληλουχίες του RNA (231). Η PRMT1 συνδέεται άμεσα στη hnRNP K, και μπορεί να ρυθμίζει τις πολλαπλές λειτουργίες αυτής της πρωτεΐνης, περιλαμβανομένης της γονιδιακής ρύθμισης και πρωτεϊνικής έκφρασης, και δρα ως συνενεργοποιητής (232,233). Η ενεργότητα της πρωτεΐνης FMR1 (fragile X mental retardation syndrome 1 homolog), η οποία συνδέεται με ένα υποπληθυσμό mRNAs και ρυθμίζει τη μετάφρασή τους, ρυθμίζεται μέσω της μεθυλίωσης από την PRMT1 (234).

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η PRMT1 εμπλέκεται στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων μέσω της ρύθμισης των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-RNA. Η μεθυλίωση της αργινίνης συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος καθοδικά διάφορων υποδοχέων, όπως ο TCR (T-cell receptor), οι υποδοχείς κυτταροκινών, οι NGF υποδοχείς, ο υποδοχέας της ιντερφερόνης, ο υποδοχέας της ινσουλίνης και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς (235). Η έκθεση κυττάρων σε ινσουλίνη έχει βρεθεί ότι οδηγεί στη μετατόπιση της PRMT1 στην κυτταρική μεμβράνη, όπου μεθυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες. Η καταστολή της έκφρασης της PRMT1 εξασθενεί το σηματοδοτικό καταρράκτη από τον υποδοχέα της ινσουλίνης (IR), δείχνοντας ότι η PRMT1 είναι ένας θετικός ρυθμιστής της λειτουργίας του IR (236). Η μεθυλίωση του υποδοχέα α των οιστρογόνων (ERα) είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδρασή του με την PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) και τον Src και τη στρατολόγηση της FAK (focal adhesion kinase), οδηγώντας σε καθοδική σηματοδότηση (237). Η PRMT1 αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα της ιντερφερόνης, και η καταστολή της έκφρασης της PRMT1 παρεμβαίνει στη βιολογική λειτουργία του υποδοχέα (238). Μετά τη σύνδεση με το πρόσδεμα, ο FXR (farnesoid X receptor) πυρηνικός υποδοχέας συνδέεται στην PRMT1 και την μεταφέρει σε ειδικές περιοχές του DNA, όπου παρατηρείται υπερέκφραση των γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης της H4R3 (239). Η PGC-1α είναι ένας συνενεργοποιητής των πυρηνικών υποδοχέων, και η μεθυλίωσή της από την PRMT1 είναι απαραίτητη για την ικανότητά της να επηρεάζει τα γονίδια στόχους (240).

Η PRMT1 παίζει ρόλο στην TCR σηματοδότηση, όπως επίσης στη σηματοδότηση μέσω του IFN-STAT (signal transducer and activator of transcription) μονοπατιού (241). Στα T κύτταρα, η μεθυλίωση της αργινίνης έχει αναφερθεί πως είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της NIP45, ενός συμπαράγοντα του NFAT (nuclear factor of activated T cells) (242). Αυτή η μεθυλίωση ρυθμίζει την NIP45-NFAT πρωτεϊνική αλληλεπίδραση, ενισχύοντας τη μεταγραφή αρκετών κυτταροκινών που είναι σημαντικές για τη χυμική ανοσολογική απόκριση, περιλαμβανομένης της IFN και της ιντερλευκίνης 4. Η PRMT1 καταστέλλει ένα μέρος των γονιδιακών στόχων της IFN-επαγόμενης STAT1 μέσω επίδρασης στην PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1) (241). Έχει βρεθεί ότι η PRMT1 μεθυλιώνει την PIAS1, οδηγώντας στην προσέλκυση της πρωτεΐνης σε ειδικούς υποκινητές και την απελευθέρωση της STAT1, ένα μηχανισμό τερματισμού της μεταγραφής.

Η μεθυλίωση της αργινίνης είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση των διπλών θραύσεων του DNA (DSBs) (154). Οι βλάβες στο DNA οδηγούν σε μία σύνθετη κυτταρική απόκριση, ενοχοποιώντας μια πληθώρα παραγόντων υπεύθυνων για την ανίχνευση, τη σηματοδότηση και την επιδιόρθωση των θραύσεων του DNA (243). Η αρχική απόκριση στις DSBs απαιτεί την προσέλκυση πολλών πρωτεϊνών, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, που θα ρυθμίσουν τη σηματοδότηση της βλάβης στο DNA και την επιδιόρθωσή του (244). Ένα από τα πρώτα βήματα είναι η φωσφορυλίωση ενός μεγάλου αριθμού στόχων όπως οι PI3K-προσομοιάζουσα κινάση (PIKK), μέλος της οικογένειας των μεταλλαγμένων ομολόγων της ataxia telangiectasia (ATM), ataxia telangiectasia και Rad3 σχετιζόμενη (ATR) και DNA-πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK) (245). Αμέσως μετά τη βλάβη στο DNA, η ιστόνη H2AX φωσφορυλιώνεται από την PIKK στη

σερίνη 139 γύρω από τις θραύσεις του DNA (246), και ακολουθείται από την προσέλκυση διάφορων παραγόντων απόκρισης στις βλάβες του DNA, όπως ο MDC1 (mediator of DNA-damage checkpoint 1) (247), η RNF8 (ring finger protein 8) (248,249), το MRN (MRE11-NBS1-RAD50) σύμπλοκο (250,251), το BRCA1 (breast cancer 1) (252), και το 53BP1. Αυτή η καλά οργανωμένη απόκριση οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1/S και G2/M (253). Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου επιτρέπει την επιδιόρθωση του DNA με NHEJ (non-homologous end joining) και HR (homologous recombination). Παρ' ότι οι βλάβες στο DNA προκαλούνται από χημειοτοξικούς παράγοντες ή από ακτινοβολία γ, μπορούν να συμβούν φυσιολογικά στα κύτταρα κατά τη διάρκεια της διάσπασης της φουρκέτας αντιγραφής (254), στα τελομερή (255) και κατά τη διάρκεια της γήρανσης (256,257,258).

Ο Yu et al.(2009), έδειξε ότι η απώλεια της PRMT1 οδηγεί σε άμεση βλάβη στο DNA, καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου, ανεπάρκεια των σημείων ελέγχου, ανευπλοειδία και πολυπλοειδία. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η καταστολή της PRMT1 προκαλούσε συχνές ανωμαλίες, περιλαμβανομένης της υψηλής συχνότητας χρωμοσωμικής έλλειψης και προσθήκης. Η απώλεια της PRMT1 είχε επιπλέον σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη κυττάρων με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Στην ίδια εργασία παρατηρήθηκαν και χρωμοσώματα με δύο κεντρομερίδια (186). Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης δείχνουν ότι η απώλεια της PRMT1 οδηγεί σε γενωμική αστάθεια.

Η PRMT1 πιθανότατα μεθυλιώνει πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες του DNA και δύο από τα γνωστά μέχρι τώρα υποστρώματα είναι η MRE11 και η 53BP1 (154,155,156). Η μεθυλίωση της αργινίνης της MRE11 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της στη θέση της βλάβης του DNA και για την κατάλληλη ρύθμιση της δράσης της ως εξωνουκλεάση (154). Επιπλέον, η έλλειψη της PRMT1 ελαττώνει την προσέλκυση του RAD51 στη θέση της βλάβης του DNA (186). Η 53BP1 φαίνεται επίσης ότι μεθυλιώνεται κατά τη διάρκεια της απόκρισης στη βλάβη του DNA (156,259). Το GAR μοτίβο της 53BP1 μεθυλιώνεται από την PRMT1 και ρυθμίζει την ικανότητά της να συνδέεται με το DNA (259) και να ολιγομερίζεται (156). Η μεθυλίωση της πολυμεράσης β από την PRMT6 αυξάνει την ικανότητά της για επιδιόρθωση του DNA, δείχνοντας τη ρυθμιστική δράση της PRMT6 στην επιδιόρθωση με εκτομή της βάσης (157).

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η PRMT1 σχετίζεται με τις ανθρώπινες τελομεράσες (260). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο TRF2 (telomeric repeat-binding factor 2), ένα συστατικό του shelterin συμπλόκου που προστατεύει τα τελομερή, είναι υπόστρωμα της PRMT1 (261). Φαίνεται ότι η PRMT1 είναι θετικός ρυθμιστής της διατήρησης του μήκους των τελομερών. Είναι γνωστό ότι κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση παίζουν η καταστολή του μονοπατιού επιδιόρθωσης του DNA και η διατήρηση των τελομερών. Η PRMT1 τροφοδοτεί αυτά τα δύο μονοπάτια και η καταστολή της προωθεί τη συσσώρευση βλαβών στο DNA.

Ένα κλασικό παράδειγμα μεταγραφικής ρύθμισης ογκογονιδίων είναι το μέλος της οικογένειας AP-1, c-Jun, το οποίο καθοδηγεί το μη φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και το μετασχηματισμό καθώς συνεργάζεται με πολλά ογκογονίδια. Το PRMT1 έχει βρεθεί ότι μεθυλιώνει το RACO-1, που είναι συνενεργοποιητής του c-Jun, σε δύο κατάλοιπα αργινίνης, και αυτή η μεθυλίωση επιτρέπει στο RACO-1 να πάρει

μία κατάλληλη διαμόρφωση για να συνδεθεί με το c-Jun. Συνεπώς, η καταστολή του PRMT1, από shRNA, μειώνει τη μεθυλίωση του RACO-1 και τη σύνδεση με το c-Jun, οδηγώντας σε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Τα παραπάνω δείχνουν ότι η PRMT1, το RACO-1 και το c-Jun συνεργάζονται στον έλεγχο της μεταγραφής των ίδιων γονιδίων, και η μεθυλίωση επιδρά σε μια σειρά από γεγονότα που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του AP-1. Η μεθυλίωση της αργινίνης του RACO-1 είναι κρίσιμη, επίσης, διότι διευκολύνει τις αλλαγές στη διαμόρφωση του RACO-1 και βοηθάει τη λειτουργία του RACO-1 ως συνενεργοποιητή του c-Jun (262).

2B) Συμμετοχή της PRMT1 στις διάφορες ασθένειες

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA και οι αλλαγές στις ιστόνες, παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο (263). Λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλία των υποστρωμάτων της PRMT1 στο κύτταρο, είναι πολύ πιθανό ότι η PRMT1 και η μεθυλίωση της αργινίνης συνδέονται με πολλές ασθένειες (77). Στον καρκίνο του προστάτη, η μεθυλίωση της H4R3 δείχνει τον κίνδυνο για επανεμφάνιση του καρκίνου του προστάτη (264).

Πρόσφατα, αποδείξαμε ότι σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, η έκφραση ενός από τα προϊόντα του εναλλακτικού ματίσματος του PRMT1 σχετίζεται με διάφορες κλινικές και παθολογικές παραμέτρους (265). Όμοια, τα σχετικά επίπεδα των ισομορφών της PRMT1 διαφέρουν μεταξύ κανονικών και καρκινικών ιστών του μαστού, με δύο από τις ισομορφές να υποεκφράζονται (182,183). Συνεπώς, φαίνεται ότι η έκφραση της PRMT1 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του όγκου. Μελέτες έχουν αρχίσει να εξετάζουν τον ρόλο της PRMT1 και σε άλλες μορφές καρκίνου. Η PRMT1 είναι σημαντικό στοιχείο του MLL (Mixed Lineage Leukaemia) μεταγραφικού συμπλόκου που τροποποιεί τις ιστόνες μέσω μεθυλίωσης στο H4R3, και ακετυλίωσης (217). Αυτό αποτελεί μία πρώτη απόδειξη του άμεσου ρόλου της μεταγραφικής ενίσχυσης μέσω της PRMT κατά τη διάρκεια της καρκινικής προόδου. Η PRMT1, όπως επίσης η PRMT3 και η PRMT6, μεθυλιώνουν την PABPN1 (nuclear poly(A)-binding protein) σε μία θέση κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο (266). Αυτή η περιοχή εμπλέκεται στην αύξηση της PABPN1, όπου η μη φυσιολογική αύξηση της πρωτεΐνης σχετίζεται με την οφθαλμοφαρυγγική μυική δυστροφία (267). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι ένα γονίδιο που εμπλέκεται στη αμυλοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), το TLS/FUS, είναι συχνά η αιτία ή το αποτέλεσμα του καρκίνου και το TLS/FUS συχνά φέρει μεταλλαγμένες αργινίνες σε συγκεκριμένες οικογενείς μορφές της νόσου (268,269). Αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές διατηρούνται στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που συμφωνεί με τις αναφορές που δείχνουν το ρόλο της μεθυλίωσης της αργινίνης στη μετακίνηση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (107,189,218,223). Αυτά τα ευρήματα μπορεί να ενοχοποιούν τη PRMT1 σε αυτή τη νόσο, μια υπόθεση που ενισχύεται από προηγούμενες αναφορές που δείχνουν ότι το TLS/FUS μεθυλιώνεται σε τουλάχιστον 20 κατάλοιπα αργινίνης (270).

Η PRMT1, περιλαμβανομένων των ισομορφών του εναλλακτικού ματίσματος, εντοπίζεται επίσης στο κυτταρόπλασμα, όπου μεθυλιώνει πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, ο ER αποτελεί ένα τέτοιο στόχο της PRMT1. Τα επίπεδα έκφρασης του ER στον καρκίνο του μαστού είναι κρίσιμα

για την πρόγνωση της ασθένειας, και εμπλέκεται στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού. Ο Le Romancer et al.(2008), (237,271) αναφέρει ότι η PRMT1 μεθυλιώνει τον ERα στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (R260), τόσο *in vitro* όσο και στα κύτταρα, και η έκθεση σε οιστρογόνο των MCF7 κυττάρων αυξάνει άμεσα τη μεθυλίωση. Η ανοσοϊστοχημική χρώση επιθηλιακών κυττάρων του μαστού με τη χρήση αντισώματος έναντι του μεθυλιωμένου ERα δείχνει ότι ο μεθυλιωμένος ERα εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Επιπρόσθετα, η μεθυλίωση του ERα είναι απαραίτητη για τη σύνδεση του ERα με τον SRC και τον FAK (focal adhesion kinase), και η μετάλλαξη του ERα-R260 στην αλανίνη ή η αποσιώπηση της ενδογενούς PRMT1 οδηγεί στην ανικανότητα του οιστρογόνου να ενεργοποιήσει το AKT. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μεθυλίωση του ERα από την PRMT1 είναι αναγκαία προϋπόθεση για την ενεργοποίηση του SRC-PI3K-FAK καταρράκτη και του AKT, συντονίζοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Η υπερμεθυλίωση του ERα στον καρκίνο του μαστού μπορεί να προκαλεί υψηλή ενεργοποίηση αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού, δίνοντας έτσι πλεονέκτημα επιβίωσης στα καρκινικά κύτταρα, ακόμα και υπό την παρουσία φαρμάκων κατά των οιστρογόνων (185,237,271).

Οι διαταραχές του WNT σηματοδοτικού μονοπατιού αποτελούν ένα διαδεδομένο στοιχείο στη βιολογία του καρκίνου. Η *axin*, ένας αρνητικός ρυθμιστής της WNT σηματοδότησης, είναι πρωτεΐνη κλειδί του συμπλόκου καταστροφής της β-κατενίνης. Οι *axins* είναι επίσης ογκοκαταστολείς, που παρουσιάζουν μεταλλάξεις τόσο στους οικογενείς όσο και τους σποραδικούς καρκίνους (272). Η μεθυλίωση της *axin* από την PRMT1 εμποδίζει την *axin* από την αποικοδόμηση του (273). Η σταθεροποίηση της *axin* από την PRMT1 προκαλεί μείωση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης και συνεπώς μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα που εξαρτάται από τη β-κατενίνη.

Επιπλέον, τα διαφορετικά επίπεδα κυκλοφορούσας ADMA, που παράγεται από την πρωτεόλυση ασύμμετρα διμεθυλιωμένων πρωτεϊνών, ενοχοποιούνται σε διάφορες ασθένειες. Τα επίπεδα της ADMA συμμετέχουν άμεσα σε ποικίλες ασθένειες καθώς αυτό το προϊόν μεταβολισμού είναι ένας ενδογενής ανταγωνιστής αναστολέας της NOS (nitric oxide synthase), μειώνοντας την παραγωγή του οξειδίου του αζώτου (274). Το οξείδιο του αζώτου λειτουργεί ως πιθανό αγγειοδιασταλτικό στα αγγεία, και έτσι μειώνοντας την παραγωγή του μπορεί να έχουμε σημαντικές συνέπειες στο καρδιαγγειακό σύστημα. Καθώς η PRMT1 είναι το κύριο ένζυμο που σχηματίζει ADMA, η καταστολή της ενεργότητάς του είναι πιθανό πως ελέγχει τις καρδιαγγειακές νόσους (275,276,277), και άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως ο σακχαρώσης διαβήτης (278,279), η ηπατική ανεπάρκεια (280,281,282) και οι χρόνιες πνευμονικές νόσοι (283). Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση της PRMT1 και της PRMT3 αυξάνεται στη στεφανιαία νόσο (284). Τα παραπάνω συνοδεύονται και από μείωση της DDAH 2 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2), ενός ενζύμου που συμμετέχει στο μεταβολισμό της ADMA, όπως επίσης και άλλων γονιδίων του μονοπατιού σύνθεσης του NO, η οποία θεωρείται ότι εξηγεί τα αυξημένα ποσά του οξειδωτικού στρες. Η αύξηση της ADMA παρατηρείται επίσης σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, λόγω της ελαττωμένης κάθαρσης αυτού του μεταβολίτη από την κυκλοφορία (280). Στην αλκοολική κίρρωση, η έκφραση της PRMT1 στο ήπαρ είναι αυξημένη, έχοντας σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων

της ADMA (285). Έτσι, τα επίπεδα της κυκλοφορούσας ADMA παρατηρούνται σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Επιπρόσθετα, το φαινόμενο της μεθυλίωσης (νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών) έχει συνδεθεί κατά καιρούς με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Η μεθυλίωση της MBP (myelin basic protein) εμπλέκεται στη διατήρηση της ακεραιότητας του περιβλήματος μυελίνης των νευρικών κυττάρων. Η αναστολή της μεθυλίωσής της οδηγεί σε μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από τον εκφυλισμό του μυελινικού περιβλήματος (subacute combined degeneration) (286,287).

Στην περίπτωση του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, φαίνεται ότι η παρουσία συμμετρικά διμεθυλιωμένων καταλοίπων αργινίνης αυξάνει τη συγγένεια των anti-Sm αυτοαντισωμάτων προς τον αντιγονικό τους επίτοπο (288).

Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ότι η ενεργότητα της πρωτεΐνης NS3 του HCV (*hepatitis C virus*) καθορίζεται από τη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης που αυτή περιέχει (289).

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PRMT1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο ρόλος της μεθυλίωσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια να γίνεται καλύτερα κατανοητός. Μία μελέτη του Ou et al.(2011), έδειξε ότι η CARM1 (PRMT4) έχει συνενεργοποιητικό ρόλο στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η CARM1 αλληλεπιδρά με την β-κατενίνη και πιθανότατα ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από την β-κατενίνη. Στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου φαίνεται πως η καταστολή της CARM1 μειώνει την έκφραση των γονιδιακών στόχων των Wnt/β-κατενίνη, και ελαττώνει την κλωνική επιβίωση και την ανάπτυξη. Η μελέτη αυτή απέδειξε ότι η CARM1 είναι ένας σημαντικός θετικός ρυθμιστής της Wnt/β-κατενίνη μεταγραφής και του νεοπλασματικού μετασχηματισμού (290).

Υπάρχουν δεδομένα που καταδεικνύουν πιθανή σχέση της λειτουργία του πρωτεϊνικού προϊόντος του PRMT1 με τον καρκίνο. Τέτοια δεδομένα αποτελούν η υπερέκφραση ορισμένων από τα υποστρώματα του ενζύμου σε ορισμένους όγκους, καθώς και η δραματική αύξηση της κυτταρικής μεθυλίωσης καταλοίπων αργινίνης, όπως έχει αναφερθεί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (291,292,293).

Τα γεγονότα μεθυλίωσης φαίνονται να συνδέονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτές τις διαδικασίες, στην περίπτωση των ιστόνων είναι ιδιαίτερα σημαντικά όσον αφορά τη διατήρηση ενός συγκεκριμένου μεταγραφικού προγράμματος και τον καθορισμό της κυτταρικής ταυτότητας και «μοίρας». Ακόμα, η δράση μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης εμφανίζεται αντιστρόφως ανάλογη της κυτταρικής ανάπτυξης και ογκογένεσης (144,178). Δεν πρέπει επίσης να ξεχνάμε ότι πολλοί καρκίνοι είναι ορμονοεξαρτώμενοι και, καθώς οι πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης είναι γνωστές για τη λειτουργία τους σαν συν-ενεργοποιητές πυρηνικών υποδοχέων, αποτελούν υποψήφια μόρια για μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση.

Τέλος, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι η παραγωγή εναλλακτικών ισομορφών μπορεί να αποτελεί συνέπεια της εμφάνισης ασθενειών, όπως ο καρκίνος (294), καθώς και το γεγονός ότι περίπου το 10–30% των ανθρώπινων γονιδίων που υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα έχουν ιστοειδικές ιστομορφές (295). Σε πολλές περιπτώσεις, οι δραματικές αλλαγές στα πρότυπα εναλλακτικού μάτισματος σχετίζονται με τις νεοπλασίες και τη μετάσταση (296,297).

Για όλους λοιπόν τους παραπάνω λόγους, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στο γονίδιο PRMT1 και τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Καθώς, επίσης, και η αναζήτηση του αν η σχέση αυτή επεκτείνεται και σε άλλους επιθηλιακούς ιστούς, όπως αυτός του μαστού.

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

α) Απομόνωση ολικού RNA

Η εκχύλιση του RNA είναι ο καθαρισμός του RNA από βιολογικά δείγματα. Αυτή η διαδικασία είναι περίπλοκη εξαιτίας της διαδεδομένης παρουσίας ριβονουκλεασών στα κύτταρα και τους ιστούς, που μπορούν ταχέως να αποικοδομήσουν το RNA. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία για την απομόνωση του RNA, η πιο κοινή είναι η Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform εκχύλιση. Οι ιστοί παχέος εντέρου, οι οποίοι συλλέχθηκαν από το χειρουργείο, μεταφέρθηκαν ταχέως στο παθολογοανατομικό εργαστήριο, και αφού ελήφθησαν τα δείγματα για τους ιστολογικούς ελέγχους ελήφθησαν και δείγματα που τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο. Η όλη διαδικασία εγένετο σε λιγότερο από ½ ώρα. Προκειμένου να γίνει η απομόνωση του ολικού RNA, αρχικά, οι ιστοί κόπηκαν σε μικρά κομματάκια με τη βοήθεια νυστεριού, υπό ψύξη (πάγος και υγρό άζωτο). Στην συνέχεια, προστέθηκε 1ml TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, ΗΠΑ) ανά 100mg ιστού, και ομογενοποιήθηκαν με τη συσκευή Polytron (Kinematica AG, Ελβετία).

Ο ομογενοποιημένος ιστός φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 10 λεπτά στους 4°C, σε φυγόκεντρο της εταιρείας Hettich Zentrifugen (Γερμανία). Το υπερκείμενο μεταφέρεται και αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο / 1ml TRIzol® που προστέθηκε αρχικά, γίνεται έντονη ανακίνηση για 15sec και αφήνεται το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, λαμβάνεται η ανώτερη υδατική φάση, η οποία περιέχει το RNA. Προστίθενται απόλυτη αιθανόλη σε αναλογία 500μl / 1ml TRIzol®, παραμένει το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και μετά φυγοκεντρείται 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το RNA καταβυθίζεται σαν ίζημα στο κάτω μέρος του σωλήνα. Ακολούθως, το ίζημα ξεπλένεται με 1ml κρύου διαλύματος 75% αιθανόλης, φυγοκεντρείται στις 10.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C και αφήνεται να στεγνώσει. Στο τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε DEPC treated H₂O (νερό απαλλαγμένο από νουκλεολυτικά ένζυμα), επωάζεται στους 55°C για 10 λεπτά και φυλάσσεται στους -80°C.

β) Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA είναι απαραίτητη για τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων. Για το σκοπό αυτό μετράμε την απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και με τη χρήση κατάλληλων μαθηματικών τύπων προσδιορίζεται τελικά η συγκέντρωση. Απορρόφηση 1 μονάδας στα 260nm αντιστοιχεί σε 40μg RNA ανά ml. Αυτή η σχέση είναι έγκυρη μόνο για μετρήσεις σε ύδωρ. Ως εκ τούτου, εάν είναι απαραίτητο να διαλύεται το δείγμα RNA, αυτό θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ύδωρ. Επίσης, το πηλίκο των αποτελεσμάτων στα 260nm και στα 280nm (A₂₆₀/A₂₈₀) δίνει μια εκτίμηση της καθαρότητας του RNA, λαμβάνοντας υπόψιν τα συστατικά που απορροφούν τις UV, όπως η πρωτεΐνη και η φαινόλη.

Εντούτοις, το πηλίκιο A260/A280 επηρεάζεται σημαντικά από το pH. Καθώς για το ύδωρ δεν χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα, τόσο το pH όσο και το πηλίκιο A260/A280 μπορεί να ποικίλουν σημαντικά. Το χαμηλότερο pH έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερο πηλίκιο A260/A280 και μειωμένη ευαισθησία στη μόλυνση από πρωτεΐνη. Για πιο ακριβείς μετρήσεις θα πρέπει να μετράται η απορρόφηση στα 10mM Tris•Cl, pH 7,5. Το καθαρό RNA έχει πηλίκιο A260/A280 της τάξης του 1,9 – 2,1 στα 10 mM Tris•Cl, pH 7,5. Το φασματοφωτόμετρο θα πρέπει πάντοτε να καλιμπράρεται με το ίδιο διάλυμα. Εάν υπάρχει μόλυνση με πρωτεΐνη ή φαινόλη, το πηλίκιο A260/A280 θα είναι μικρότερο από τις προαναφερθείσες τιμές, και η ακριβής ποσοτικοποίηση του RNA δεν θα είναι δυνατή.

Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φωτόμετρου Hitachi UV-VIS (U-2000) (ΗΠΑ), αραιώνοντας το απομονωμένο δείγμα 1:200 (5μl δείγμα και 995μl απιονισμένου νερού (dH₂O)). Στη συνέχεια, το δείγμα φωτομετρείται στα 260nm και στα 280nm και μετράται η απορρόφηση σε αυτά τα μήκη κύματος. Τα συγκεκριμένα μήκη κύματος επιλέχθηκαν λόγω του ότι το RNA παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 260nm. Ο λόγος A_{260nm} / A_{280nm} μας δίνει την καθαρότητα του δείγματος RNA. Ο ιδανικός λόγος είναι 1,7 – 1,9 (τα δείγματα περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά RNA). Τέλος, έγινε καθαρισμός των δειγμάτων RNA από προσμίξεις, όταν ο λόγος A_{260nm} / A_{280nm} ήταν εκτός των τιμών 1,7 – 1,9. Τιμές απορρόφησης είτε μεγαλύτερες είτε μικρότερες αυτών των ορίων υποδεικνύουν επιμόλυνση του δείγματος είτε με DNA είτε με πρωτεΐνες. Το δείγμα αραιώνεται με προσθήκη DEPC treated H₂O ως τελικού όγκου 200μl. Προστίθενται 400μl μείγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1) και το δείγμα ανακινείται έντονα. Μετά από παραμονή 2 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Λαμβάνεται η υπερκείμενη υδατική φάση, στην οποία προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος οξικού νατρίου (CH₃COONa) 0,3M (pH 5,5) και τριπλάσιος όγκος απόλυτης αιθανόλης. Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C για 30 λεπτά και ακολούθως στους -80°C για ακόμα 30 λεπτά. Μετά το πέρας της ώρας, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα στεγνώνεται και διαλύεται σε DEPC treated H₂O.

γ) Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA έγινε με χρήση του kit Superscript™ II • Reverse – Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται επώζοντας 2μg ολικού RNA και 10μl από το μείγμα I στους 70°C για 10 λεπτά και αμέσως μετά σε πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό. Στη συνέχεια, προστίθενται 7μl από το μείγμα II και γίνεται καλή ανάμειξη. Το δείγμα επωάζεται στους 42°C για 5 λεπτά, προστίθεται 1μl ενζύμου Thermoscript® RT (Invitrogen, ΗΠΑ) (αντίστροφη μεταγραφάση) 15U/μl και επωάζεται στους 42°C για 50 λεπτά και στους 70°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, τοποθετείται σε πάγο και προστίθεται 1μl ενζύμου RNaseH (Invitrogen, ΗΠΑ) 2U/μl, για τον κατακερματισμό του RNA που δεν έχει μετατραπεί σε cDNA. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20 λεπτά και φύλαξη του δείγματος στους -20°C (πίνακας 8).

Πίνακας 8: μείγματα I και II που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση cDNA

Μείγμα I	Μείγμα II
9μl DEPC treated H ₂ O 1μl oligo(dTs) 0,5μg/μl	2μl 5x cDNA Synthesis Buffer (Invitrogen, ΗΠΑ) 2μl MgCl ₂ 25mM 1μl dNTPs mix 10mM 2μl DTT 0,1M

Τέλος, η επιτυχής σύνθεση του cDNA ελέγχθηκε με τον πολλαπλασιασμό του cDNA ενός γονιδίου που εκφράζεται σταθερά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, όπως η ακτίνη.

Ο πολλαπλασιασμός του cDNA της ακτίνης έγινε με την ανάμειξη 0,6μl cDNA, 2 U Platinum Taq polymerase (Invitrogen), 2μl διαλύματος PCR buffer (10X) {(200mM Tris – HCl (pH 8.4), 500mM KCl), 0,8μl MgCl₂ (50mM), 0,4μl μείγματος dNTPs (10mM)} (Invitrogen) και 4μl από κάθε ειδικό εκκινητή (primer)(0,1μg/μl). (Η αλληλουχία των εκκινητών φαίνεται στον πίνακα 9 που ακολουθεί) Το δείγμα τοποθετείται σε κυκλοποιητή (PTC-200 thermal cycler, MJ Research, Inc., ΗΠΑ). Το πρωτόκολλο του πολλαπλασιασμού είναι επώαση για 15 λεπτά στους 95°C, ακολουθείται από 35 κύκλους στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 62°C για 60 δευτερόλεπτα και 72°C για 60 δευτερόλεπτα, και ένα τελευταίο βήμα στους 72°C για 10 λεπτά.

δ) Πολλαπλασιασμός του cDNA του PRMT1

Ο πολλαπλασιασμός του cDNA του **PRMT1** έγινε με την ανάμειξη 0,8μl cDNA, 2 U Platinum Taq polymerase (Invitrogen), 2μl διαλύματος PCR buffer (10X) {(200mM Tris – HCl (pH 8.4), 500mM KCl), 0,8μl MgCl₂ (50mM), 0,4μl μείγματος dNTPs (10mM)} (Invitrogen) και 4μl από κάθε ειδικό εκκινητή (0,1μg/μl). (Η αλληλουχία των εκκινητών φαίνεται στον πίνακα 9 που ακολουθεί) Το δείγμα τοποθετείται σε κυκλοποιητή (PTC-200 thermal cycler, MJ Research, Inc., ΗΠΑ). Το πρωτόκολλο του πολλαπλασιασμού είναι επώαση για 15 λεπτά στους 95°C, ακολουθείται από 40 κύκλους στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 64,5°C για 60 δευτερόλεπτα και 72°C για 60 δευτερόλεπτα, και ένα τελευταίο βήμα στους 72°C για 10 λεπτά.

Πίνακας 9: αλληλουχίες των μορίων εκκινητών (primers) για τα γονίδια PRMT1 και β-ακτίνης

Γονίδιο		Αλληλουχία μορίων-εκκινητών	Μέγεθος προϊόντων
β-ακτίνη	Forward	5'-ATCTCGCACCCACCTTCTA-3'	372bp
	Reverse	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3'	
PRMT1	Forward	5'-GAGGCCGCGAACTGCATCAT-3'	PRMT1v3 502bp
	Reverse	5'-TGGCTTTGACGATCTTCACC-3'	PRMT1v2 385bp PRMT1v1 331bp

Μετά το τέλος της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, μαζί με κατάλληλο δείκτη μοριακού μεγέθους (100bp DNA ladder, Invitrogen, ΗΠΑ) και το DNA οπτικοποιείται με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου.

ε) Προσδιορισμός της αλληλουχίας για την ταυτοποίηση των ισομορφών του PRMT1

Τα προϊόντα της PCR μετά την ηλεκτροφόρησή τους απομονώνονται και καθαρίζονται προκειμένου να αποσταλούν για αλληλούχηση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε εμπορικό kit της εταιρίας Qiagen (Maryland, USA). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή

στ) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των προϊόντων της PCR

Η συγκέντρωση του cDNA μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση μιας ημιποσοτικής μεθόδου. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με ένα δείκτη μοριακού μεγέθους, για τον οποίο ταυτόχρονα γνωρίζουμε τη συγκέντρωση του DNA που περιέχει κάθε ζώνη του δείκτη. Συγκρίνοντας λοιπόν τη φωτεινότητα του δείγματος με αυτή της αντίστοιχης ζώνης του δείκτη μπορούμε να υπολογίσουμε την περιεκτικότητα του δείγματος.

Για το λόγο αυτό, τα δείγματα αραιώνονται 1:5 με dH₂O, μέχρι τελικού όγκου 5μl και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα 1% αγαρόζης, μαζί με δείκτη μοριακού βάρους (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, ΗΠΑ) κατάλληλο για ποσοτικοποίηση και ηλεκτροφορούνται στα 110Volts. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, φωτογραφίζεται και γίνεται σύγκριση της φωτεινότητας των ζωνών, προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του δείγματος. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα δοκιμασία, έγινε χρήση του συστήματος Gel Logic 100 Imaging System της Kodak.

ζ) Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων

Τα αντισώματα διαθέτουν την ιδιότητα της εξειδίκευσης, δεσμεύοντας μόνο το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους. Τα πολυκλωνικά αντισώματα (παραγωγή από πολλούς διαφορετικούς κλώνους Β-λεμφοκυττάρων) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εργαστηριακή πρακτική για τον εντοπισμό ενός βιολογικού μορίου, εφόσον λόγω εξειδίκευσης μπορούν να προσδεθούν αποκλειστικά στο μόριο για το οποίο έχουν δημιουργηθεί, «αγνοώντας» τα υπόλοιπα.

Η παραγωγή των πολυκλωνικών αντισωμάτων κουνελιού έναντι του PRMT1 έγινε σε New England λευκά κουνέλια, στο εργαστήριό μας. Το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον του PRMT1 έχει την αμινοξική αλληλουχία FGTIGMRPNAKNNRDLDFTI (πίνακας 10). Το πεπτίδιο συντέθηκε από την εταιρία Invitrogen (ΗΠΑ). Η επιλογή του συγκεκριμένου τμήματος έγινε με βάση το γεγονός ότι βρίσκεται επιφανειακά στο μόριο και είναι κοινό τμήμα όλων των ισομορφών της πρωτεΐνης.

Πίνακας 10. Αμινοξέα με τα αντίστοιχα σύμβολά τους

Σύμβολο	Ονομασία Αμινοξέος	Σύμβολο	Ονομασία Αμινοξέος
F	L-Φαινυλαλανίνη	P	L-Προλίνη
G	Γλυκίνη	N	L-Ασπαραγίνη
T	L-Θρεονίνη	A	L-Αλανίνη
I	L-Ισολευκίνη	K	L-Λυσίνη
M	L-Μεθειονίνη	D	L-Ασπαρτικό οξύ
R	L-Αργινίνη	L	L-Λευκίνη

Στη συνέχεια, έγινε προσδιορισμός του φορτίου και της υδροφοβικότητας του μορίου, προκειμένου να καθορισθεί ο κατάλληλος διαλύτης (το πεπτίδιο φυλάσσεται σε λυοφυλιωμένη μορφή). Για να διαλυθεί ένα πεπτίδιο σε νερό θα πρέπει να περιέχει υδρόφιλα αμινοξέα σε ποσοστό τουλάχιστον 25%, ενώ εάν περιέχει υδρόφοβα αμινοξέα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% για την διάλυση απαιτείται οργανικός διαλύτης (π.χ. DMSO, ισοπροπυλική αλκοόλη). Λόγω της παρουσίας υδρόφιλων αμινοξέων σε ποσοστό 25% και υδρόφοβων 20% ο διαλύτης που επιλέχθηκε ήταν το dH₂O.

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2 κουνέλια (New England white rabbits) 3,5kg το καθένα. Το πεπτίδιο εισάγεται με υποδόρια ένεση στο κουνέλι υπό μορφή διαλύματος που αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα.

Πίνακας 11. Σύνθεση διαλυμάτων που χορηγήθηκαν υπό μορφήν ενέσεων στα πειραματόζωα.

Διαλύματα	Δόσεις
500μg πεπτιδίου 400 μl dH ₂ O 400μl Freund's Adjuvant Complete (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ)	1 ^η ένεση
200μg πεπτιδίου 400 μl dH ₂ O 400μl Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ)	2 ^η – 6 ^η ένεση

Η 2^η ένεση έγινε δυο εβδομάδες μετά την πρώτη ενώ όλες οι επόμενες με διαφορά τριών εβδομάδων μεταξύ τους (πίνακας 11).

η) Υπολογισμός τίτλου αντισωμάτων

Πριν από κάθε ένεση στα πειραματόζωα, γίνεται λήψη ορού από 1ml αίματος (Bleeds). Ο ορός απομονώνεται από το αίμα με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Η πρώτη λήψη γίνεται πριν την εισαγωγή για πρώτη φορά του αντιγόνου (Bleed 0) και το δείγμα αυτό λειτουργεί σαν δείγμα-αναφοράς για τον υπολογισμό του τίτλου

των αντισωμάτων, μετά από σύγκριση με τις επόμενες λήψεις (Bleed 1: πριν τη δεύτερη ένεση, Bleed 2: πριν την Τρίτη ένεση κτλ).

Σε ένα 96-well plate γίνεται επίστρωση με το πεπτιδίο σε συγκέντρωση 1μg/well. Για την αραίωση του πεπτιδίου στην επιθυμητή συγκέντρωση και την επίστρωση χρησιμοποιείται ειδικό διάλυμα επίστρωσης (coating buffer: 50mM Tris (pH 7.8)). Η τελική ποσότητα του διαλύματος επίστρωσης σε κάθε πηγάδι του πιάτου επίστρωσης είναι 100μl. Για να μπορέσει να προσδεθεί το πεπτιδίο στη βάση του πηγαδιού, αφήνεται για 3 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια γίνεται διπλή πλύση με ειδικό διάλυμα (wash buffer: 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 0,5mL/L Tween 20, 0,01% Αζίδιο του νατρίου). Τα Bleeds αραιώνονται σε 6%BSA (Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοειδών), κατά 1.000, 10.000 και 100.000 φορές και τοποθετούνται στα αντίστοιχα πηγάδια. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 λεπτά και μετά πλύσιμο (6 φορές), για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος αντισώματος. Για την ανίχνευση του δεσμευθέντος αντισώματος χρησιμοποιείται δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση HRP (Horse Radish Peroxidase). Το δεύτερο αυτό αντίσωμα λαμβάνεται έτοιμο από την εταιρία Dako Cytomation (Denmark) και πρόκειται για πολυκλωνική ανοσοσφαιρίνη που έχει παραχθεί σε αίγα (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin/HRP). Πριν τη χρήση του αραιώνεται 1:2000, με 0,05M Tris-HCl (pH 7.2). Ακολούθως, τοποθετείται στα πηγάδια και επώαζεται για 30-60 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιούνται 6 πλύσεις και προστίθενται 100μl TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) και επώαζονται για 30 λεπτά. Το TMB είναι ένα χρωμογόνο που αναγνωρίζει την υπεροξειδάση και από την αντίδραση προκύπτει ένα μπλε χρώμα. Μετά το τέλος της επώασης, η αντίδραση σταματάει με προσθήκη H₂SO₄, οπότε και το περιεχόμενο των πηγαδιών, στα οποία πραγματοποιήθηκε η αντίδραση γίνεται κίτρινο. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450nm σε ειδικό μηχάνημα (Eliza Reader, Sunrise™, TECAN Trading AG, Switzerland) και καθορισμός του τίτλου από τη σύγκριση των Bleeds με το Bleed 0.

θ) Συλλογή και καθαρισμός αντισώματος

Για την απομόνωση των ανοσοσφαιρινών που παράχθηκαν από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που βρίσκονται στον ορό του αίματος, η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι της χρωματογραφίας συγγένειας. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό βιολογικών μειγμάτων, βασιζόμενη σε υψηλά εξειδικευμένες βιολογικές αλληλεπιδράσεις, όπως στην περίπτωση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, και εκμεταλλευόμενη τη συγγένεια που παρουσιάζουν μεταξύ τους αυτά τα μόρια. Τα μόρια που ενδιαφερόμαστε να απομονώσουμε, δηλαδή οι ανοσοσφαιρίνες τάξης IgG, παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια ως προς την πρωτεΐνη A και σε αυτή ακριβώς την ιδιότητα στηρίζεται όλη η τεχνική. Η πρωτεΐνη A αποτελεί συστατικό της επιφάνειας του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* και έχει την ικανότητα να αντιδρά με τις IgG, μέχρι και να δημιουργεί αδιάλυτα πλέγματα. Αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια συνδέονται με σφαιρίδια Sepharose και χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν τη στατική φάση μιας χρωματογραφικής στήλης. Η στήλη ουσιαστικά λειτουργεί σαν παγίδα για τις

ανοσοσφαιρίνες ενώ τα υπόλοιπα μόρια απλά περνάνε από τη στήλη, αφού δεν διαθέτουν τις απαιτούμενες ιδιότητες πρόσδεσης.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα.

1. 1,5g πρωτεΐνης A-Sepharose σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Na_3PO_4) συγκέντρωσης 0,1M (pH 8.0) για 30 λεπτά. Τα σφαιρίδια ενυδατώνονται, διογκώνονται και τελικά δημιουργούνται 5ml πηκτώματος.

2. Το πήκτωμα τοποθετείται στη στήλη χρωματογραφίας και κατόπιν διαβιβάζεται το ανωτέρω διάλυμα φωσφορικών, για εξισορρόπηση.

3. Τοποθετείται στη στήλη 1mL ορού και αφήνεται να διεισδύσει με αργό ρυθμό.

4. Διαβιβάζεται και πάλι διάλυμα φωσφορικών, έως ότου η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων έκλυσης ελαττωθεί στο 0,05 στα 280nm.

5. Διαβιβάζεται διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,1M (pH 6.0), μέχρι η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων έκλυσης γίνει μικρότερη από 0,05 στα 280nm, οπότε και γίνεται έκλυση των IgG. Με τη διαδοχική διαβίβαση διαλυμάτων με ελαττούμενο pH (διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,1M, pH 4.5, διάλυμα οξικού οξέος 0,1N, pH 3.0) πραγματοποιείται έκλυση και των υπόλοιπων ανοσοσφαιρινών.

6. Η στήλη εξουδετερώνεται με το αρχικό διάλυμα φωσφορικών, το οποίο περιέχει και αζίδιο του νατρίου (NaN_2) 0,02% (σαν συντηρητικό και μικροβιοκτόνο), και τοποθετείται στους 4°C.

7. Οι ανοσοσφαιρίνες που εκλύονται εξουδετερώνονται με διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 1M (pH 6.0).

ι) Υπολογισμός συγκέντρωσης αντισώματος

Μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους υπολογισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών είναι η μέθοδος Lowry (Lowry et al., 1951). Ανήκει στην κατηγορία των χρωματομετρικών μεθόδων και περιλαμβάνει δυο τέτοιου είδους αντιδράσεις (ιόντα Cu^{+2} και αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu). Ο συνδυασμός αυτών των αντιδραστηρίων έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός μπλε χρώματος, κατά την παρουσία πρωτεϊνικών μορίων.

Απαιτούνται 5 διαδοχικοί δοκιμαστικοί σωλήνες για τη δημιουργία μιας καμπύλης αναφοράς, οι οποίοι περιέχουν 0μg, 37μg, 75μg, 150μg, 300μg BSA, σε τελικό όγκο 1,2ml, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ετοιμάζονται μια σειρά δοκιμαστικών σωληνίων με τις προς μέτρηση ανοσοσφαιρίνες, σε διαφορετικές αραιώσεις και ίδιο τελικό όγκο (1,2ml). Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 6ml διαλύματος ACR (1 mL 1% (w/v) CuSO_4 , 1 mL 2 % (w/v) τρυγικό νάτριο, 98 mL 2 % (w/v) Na_2CO_3 σε 0.1 M NaOH) και πραγματοποιείται καλή ανάμειξη. Επώζονται για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 300ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Merck, Germany) και γίνεται καλή ανάμειξη. Μετά από επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το περιεχόμενο των σωληνίων φωτομετρείται σε μήκος κύματος 500nm έναντι «τυφλού» δείγματος. Από τις μετρήσεις των δοκιμαστικών σωληνίων με τις γνωστές ποσότητες BSA, δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς. Βάσει αυτής υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των προς μέτρηση δειγμάτων ανοσοσφαιρινών που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν.

κ) Ταυτοποίηση ανοσοσφαιρινών

Προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση απομονωμένων πρωτεϊνών, αυτές πρέπει να συγκριθούν με ήδη γνωστά πρωτεϊνικά μόρια. Η μέθοδος που ακολουθείται συνήθως είναι η SDS PAGE ηλεκτροφόρηση (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Οι πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται διαχωρίζονται κυρίως λόγω διαφορετικού MB.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο τμήματα, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και το πήκτωμα επιστίβαξης (stacking gel). Η σύσταση του πηκτώματος φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 12. Σύσταση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

Σύσταση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	
Πήκτωμα επιστίβαξης (5%)	0,67ml διαλύματος ακρυλαμίδης (30% (w/v) ακρυλαμίδη, 0,8% (w/v) bis-ακρυλαμίδη) 1ml διαλύματος που περιέχει 0,5M Tris-HCl (pH 6.8), 0,4% SDS), 23ml νερό, 5μl TEMED 30μl διαλύματος 10% Ammonium Persulfate
Πήκτωμα διαχωρισμού (12,5%)	4,17ml διαλύματος ακρυλαμίδης (30% (w/v) ακρυλαμίδη, 0,8% (w/v) bis-ακρυλαμίδη) 25ml διαλύματος που περιέχει 1,5M Tris-HCl (pH 8.8), 0,4% SDS) και 3,33ml νερού 50μl TEMED (N,N,N',N'-τετραμεθύλενο-αιθυλενοδιαμίνη) 50μl διαλύματος 10% Ammonium Persulfate

Κάθε δείγμα έχει όγκο 20μl και σε αυτό προστίθενται 5μl 5x Sample Buffer, θερμαίνεται στους 100°C για 3-5 λεπτά και τοποθετείται στο πήκτωμα. Μαζί με τα άγνωστα δείγματα, τοποθετείται και δείκτης μοριακού μεγέθους και δείγματα άλλων πρωτεϊνών και ανοσοσφαιρινών (BSA, IgG από άνθρωπο). Γεμίζει η δεξαμενή της συσκευής με διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS 1x και εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 150Volts. Όταν η ηλεκτροφόρηση τελειώσει, το πήκτωμα αφαιρείται από τη συσκευή και τοποθετείται σε 20ml διαλύματος Coomassie Gel Stain, για 15 λεπτά περίπου, προκειμένου να χρωματιστούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια ξεπλένεται 2-3 φορές με dH₂O και τοποθετείται σε 50ml διαλύματος Coomassie Gel Destain για περίπου 60 λεπτά, προκειμένου να καθαριστεί το πήκτωμα (πίνακας 13). Στο τέλος της διαδικασίας εμφανίζονται έντονα βαμμένες μπλε μπάντες, ορατές στο φως και το πήκτωμα φωτογραφίζεται.

Πίνακας 13. Σύσταση διαλυμάτων

Σύσταση διαλυμάτων	
5x Sample Buffer	60mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% γλυκερόλη, 2% SDS, 14,4mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,1% μπλε της βρωμοφαινόλης
διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS 1x	3g Tris, 14,4g γλυκίνη, 1g SDS + dH ₂ O ως 1L
Coomassie Gel Stain	1g Coomassie Blue R-250, 450ml μεθανόλη, 450ml dH ₂ O, 100ml οξικό οξύ
Coomassie Gel Destain	100ml μεθανόλη, 100ml οξικό οξύ, 800ml dH ₂ O

λ) Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια μέθοδος εντοπισμού πρωτεϊνικών μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων, όπως αυτά φαίνονται σε τομές ιστών. Με τη χρήση της τεχνικής αυτής, πέραν της παρουσίας ή όχι ενός αντιγόνου σε έναν ιστό, μπορεί να επιτευχθεί και ακριβής προσδιορισμός της θέσης του μέσα στο κύτταρο. Το εξειδικευμένο αντίσωμα σημαίνεται (με φθορίζουσα ουσία, ένζυμο, ραδιενεργό στοιχείο κ.ά.), ώστε να μπορεί να γίνει οπτικός εντοπισμός του προς αναζήτηση μορίου.

Τομές καρκινικών ιστών εντέρου από μπλοκ παραφίνης, πάχους 5μm, από επιλεγμένους ασθενείς που εξέφραζαν την PRMT1 σε επίπεδο RNA, τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι τομές θερμαίνονται στους 65°C, αποπαραφινολογούνται και στη συνέχεια ενυδατώνονται με διαδοχικές εμβάπτισεις σε ξυλόλη, ακολούθως ξυλόλη και αιθανόλη (1:1) και τέλος αιθανόλη σε διάφορες συγκεντρώσεις με σειρά: 100%, 96%, 80% και 70% διάρκειας 5 λεπτών. Οι πλάκες θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων για 15 λεπτά σε διάλυμα κιτρινού νατρίου 1mM (pH=6) για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων. Οι τομές ξεπλένονται σε διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline), pH 7,6 (0,15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,02% (w/v) NaN₂) και επωάζονται για 3 λεπτά σε διάλυμα 3% H₂O₂ σε μεθανόλη για να αποφευχθεί η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Οι τομές ξεπλένονται για 2 λεπτά με νερό βρύσης. Στη συνέχεια γίνεται επώαση των ιστικών τομών με 200μl πρωτογενούς πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του PRMTI, αραιωμένου 1:1500, για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, οι τομές ξεπλένονται με TBS και επωάζονται με 200μl βιοτινιλιωμένου δευτερογενούς αντισώματος αίγας έναντι IgG κουνελιού, για 40 λεπτά, ενώ ακολουθεί κι επιπλέον ξέπλυμα. Ακολουθεί επώαση με 200μl αντιδραστηρίου AB complex/HRP (Dako Cytomation, Denmark) 1:100 για άλλα 25 λεπτά, ξέπλυμα με TBS και επώαση με DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Glostrup, Denmark) για 10 λεπτά. Μετά το πλύσιμο με TBS και νερό,

οι πλάκες βυθίζονται σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Hematoxylin, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) για 2 λεπτά, αφυδατώνονται με αιθανόλη και ξυλόλη και καλύπτονται με κόλλα DePex (BDH, Limited Poole, Dorset, UK) και καλυπτρίδα. Οι αρνητικοί μάρτυρες είχαν αντί για πρωτογενές αντίσωμα, μόνο TBS. Τελικά, οι τομές μελετούνται σε μικροσκόπιο και φωτογραφίζονται ορισμένες περιοχές, μετά από επιλογή. Το ψηφιακό φωτογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Nikon Digital Sight DS-L1 (Ιαπωνία).

μ) Στατιστική ανάλυση

Η έκφραση των ισομορφών του PRMT1 διαχωρίστηκε ως θετική και ως αρνητική και συσχετίστηκε με τα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφορών αυτών και των ισομορφών του PRMT1 αναλύθηκαν με τη χρήση του chi square test (χ^2 τεστ) ή του Fisher's Exact test. Η ανάλυση παλινδρόμησης έγινε με τη χρήση του Cox μοντέλου παλινδρόμησης αναλογικών κινδύνων (298) σε μονοπαραγοντικό και πολυπαραγοντικό επίπεδο. Τα πολυπαραγοντικά μοντέλα συμπεριελάμβαναν το TNM στάδιο, την ηλικία του ασθενή και το στάδιο του όγκου. Η ανάλυση της επιβίωσης έγινε με καμπύλες Kaplan – Meier που παρουσιάζουν το διάστημα επιβίωσης ελεύθερης από ασθένεια (disease-free survival (DFS) curves) και καμπύλες που παρουσιάζουν το συνολικό διάστημα επιβίωσης (overall survival (OS) curves)(299). Οι καμπύλες αυτές κατασκευάστηκαν για όλες τις ισομορφές το PRMT1. Οι διαφορές που εμφανίστηκαν στις καμπύλες υπολογίστηκαν με logrank τεστ.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

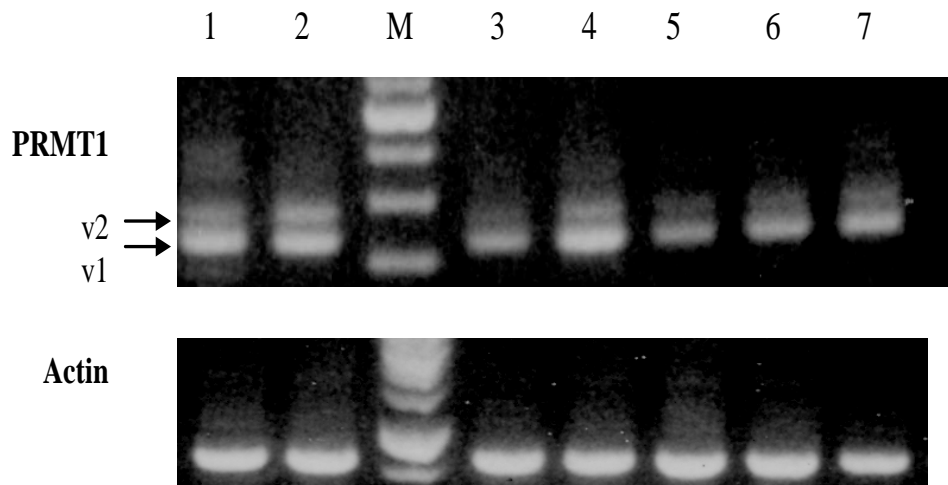
2Α) Μελέτη των προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου PRMT1

Το γονίδιο PRMT1 παράγει τρεις διαφορετικές ισομορφές του ίδιου ενζύμου (82,90) με εναλλακτικό μάτισμα. Οι ισομορφές αυτές είναι γνωστές ως v1, v2 και v3 και παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος εξαιτίας της παρουσίας ή απουσίας των εξωνίων 2 και 3. Τα τρία προϊόντα της PCR που αναμένονταν έχουν μεγέθη 331bp (v1), 385bp (v2) και 502bp (v3) (90). Συγκεκριμένα, στην v3 υπάρχουν και τα δυο εξώνια, στην v2 απουσιάζει το εξώνιο 3 ενώ στην v1 δεν υπάρχει ούτε το εξώνιο 2 ούτε το εξώνιο 3. Συγκρίνοντας την έκφραση των 3 εναλλακτικών ισομορφών του PRMT1 στις διάφορες νοσολογικές οντότητες του παχέος εντέρου με χρήση των chi square test and Fisher's exact test παρατηρούμε τα κάτωθι:

A) Η ισομορφή PRMT1-v1 εκφράζεται στατιστικά σημαντικά λιγότερο στους φλεγμονώδεις ιστούς από ότι στους καρκινωμάτεις ιστούς ($p < 0.001$) ή στα αδενώματα ($p = 0.014$).

B) Η ισομορφή PRMT1-v2 εκφράζεται στατιστικά σημαντικά περισσότερο στους καρκινωμάτεις ιστούς από ότι στους φυσιολογικούς ($p = 0.007$), στα αδενώματα σε σχέση με τους φλεγμονώδεις ιστούς ($p = 0.002$) και στους καρκινωμάτεις σε σύγκριση

με τους φλεγμονώδεις ιστούς($p<0.001$) και στατιστικά σημαντικά λιγότερο στους φλεγμονώδεις σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ($p=0.021$).
Γ) Η ισομορφή PRMT1-v3 εκφράζεται ελάχιστα σε όλες τις εξετασθείσες κατηγορίες ιστών παχέος εντέρου και συνεπώς δεν μπορούν να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα (εικόνα 17) (πίνακας 14).



Εικόνα 17: Έκφραση των ισομορφών του PRMT1 σε πρωτοπαθείς καρκινωμάτωδεις (2, 4, 6) και σε φυσιολογικούς εντερικούς ιστούς (1, 3, 5, 7). M: 100bp DNA ladder (δείκτης MB)

Πίνακας 14. Μελέτη της έκφρασης των τριών εναλλακτικών ισομορφών του γονιδίου PRMT1 στις διάφορες νοσολογικές οντότητες του παχέος εντέρου.

	PRMT1-v1 θετικό	PRMT1-v1 αρνητικό	Τιμή <i>p</i>	PRMT1-v2 θετικό	PRMT1-v2 αρνητικό	Τιμή <i>p</i>	PRMT1-v3 θετικό	PRMT1-v3 αρνητικό	Τιμή <i>p</i>
25 δείγματα φυσιολογικού εντερικού ιστού	22 (88%)	3 (12%)	0.067 ¹	6 (24%)	19 (76%)	0.007¹	0 (0%)	25 (100%)	0.782 ¹
			0.251 ²			0.193 ²			1.00 ²
			0.069 ³			0.021³			1.00 ³
90 δείγματα καρκινωμάτωσης ιστού εντέρου	88 (97.7%)	2 (2.3%)	0.747 ⁴	48 (53.3%)	42 (46.7%)	0.328 ⁴	1 (1.1%)	89 (98.9%)	0.865 ⁴
			<0.001 ⁵			<0.001 ⁵			0.818 ⁵
14 δείγματα αδενωμάτων	14 (100%)	0 (0%)	0.014⁶	6 (42.8%)	8 (57.2%)	0.002⁶	0 (0%)	14 (100%)	1.00 ⁶
20 δείγματα φλεγμονώδους εντερικού ιστού (ΙΦΝΕ)	13 (65%)	7 (35%)		0 (0%)	20 (100%)		0 (0%)	20 (100%)	

¹: Μεταξύ φυσιολογικού και καρκινωμάτωσης ιστού

²: Μεταξύ φυσιολογικού και αδενωμάτωσης ιστού

³: Μεταξύ φυσιολογικού και φλεγμονώδους ιστού

⁴: Μεταξύ καρκινωμάτωσης και αδενωμάτωσης ιστού

⁵: Μεταξύ καρκινωμάτωσης και φλεγμονώδους ιστού

⁶: Μεταξύ αδενωμάτωσης και φλεγμονώδους ιστού

2B) Μελέτη της έκφρασης του PRMT1 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

α. Συσχέτιση της έκφρασης των ισομορφών του PRMT1 με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Η μελέτη της έκφρασης του PRMT1 σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου έδειξε ότι μόνο η ισομορφή PRMT1-v2 σχετίζεται με τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους που διερευνήθηκαν. Η έκφραση των υπόλοιπων ισομορφών δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική σχέση με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους. Για το λόγο αυτό, η στατιστική ανάλυση εστίασε και στηρίχθηκε σε αυτή την ισομορφή.

Στον πίνακα 15 φαίνονται τα χαρακτηριστικά των ατόμων που απαρτίζουν την ομάδα μελέτης και στον πίνακα 16 παρουσιάζονται τα πρότυπα έκφρασης της ισομορφής PRMT1-v2 στους διαφορετικούς ιστούς παχέος εντέρου. Σαν τιμή αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή ± 2 sd.

Πίνακας 15: Κατανομή των αριθμητικών μεταβλητών της μελέτης

Μεταβλητή	Μέση τιμή \pm ΤΣ	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50	75	90
Ηλικία (χρόνια)	67.5 \pm 1.1	31-92	51.6	60.0	70.0	76.0	81.0
Μέγεθος όγκου (cm)	4.48 \pm 0.17	1.80-12.0	2.57	3.50	4.20	5.05	6.50
Ελευθέρα νόσου επιβίωση (μήνες)	37.3 \pm 2.8	0.0-132.0	0.0	0.0	48.0	58.0	64.0
Ολική επιβίωση (μήνες)	46.7 \pm 2.4	1.0-132.0	12.0	26.0	48.0	58.7	65.0

ΤΣ: Τυπικό σφάλμα

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης των ισομορφών του PRMT1 και του ιστού αναλύθηκε με την εφαρμογή του τεστ χ^2 . Η στατιστική ανάλυση για την ισομορφή PRMT1-v2 σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του παραμετρικού Fisher's Exact τεστ και του τεστ χ^2 . Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η θετική έκφραση του PRMT1-v2 σχετίζεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο με τον καρκινικό φαινότυπο ($p < 0.001$). Για τις υπόλοιπες ισομορφές δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού.

Ο πίνακας 16 απεικονίζει τη στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας θετικής έκφρασης του PRMT1-v2 σε όγκους προχωρημένου σταδίου κατά TNM ($p = 0.026$), καθώς και σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας ($p = 0.015$). Επίσης, παρουσιάζει τη θετική συσχέτιση της θετικής έκφρασης του PRMT1-v2 με την παρουσία θετικών

λεμφαδένων στους ασθενείς ($p=0.016$). Δείχνει επιπρόσθετα, ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης της ισομορφής PRMT1-v2 με το στάδιο του καρκίνου κατά Duke's.

Πίνακας 16: Συσχέτιση της έκφρασης του PRMT1-v2 με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου

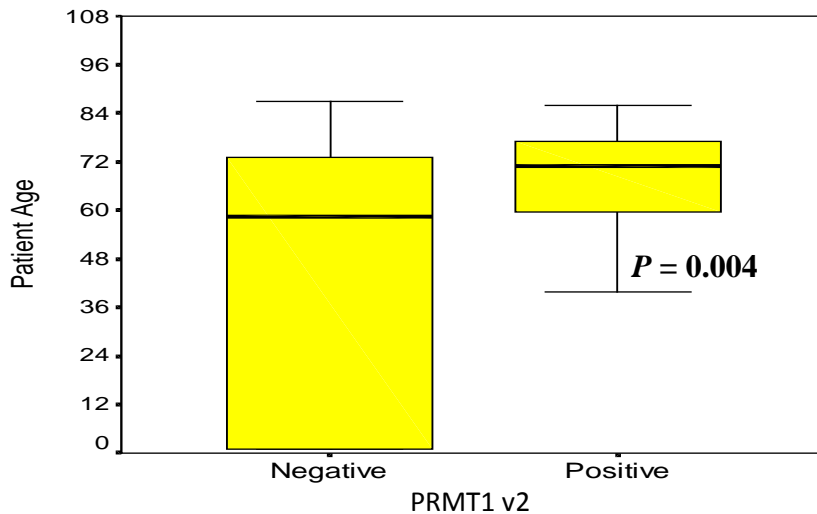
Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p
		Αρνητική έκφραση ^b PRMT1-v2	Θετική έκφραση ^b PRMT1-v2	
<u>Κατάσταση λεμφαδένων</u>	41	25 (62.5)	15 (37.5)	0.016^a
Αρνητικοί	43	15 (34.9)	28 (65.1)	
<u>Στάδιο TNM</u>				0.026^b
I	12	10 (83.0)	2 (16.7)	
II	20	9 (45.0)	11 (55.0)	
III	30	13 (43.3)	17 (56.7)	
IV	18	5 (27.8)	13 (72.2)	
<u>Στάδιο Duke's</u>				0.062^b
I	11	9 (81.8)	2 (18.2)	
II	25	10 (40.0)	15 (60.0)	
III	37	15 (40.5)	22 (59.5)	
IV	7	2 (28.6)	5 (71.4)	
<u>Βαθμός κακοήθειας</u>				0.015^b
I	14	10 (83.3)	2 (16.7)	
II	31	13 (43.3)	17 (56.7)	
III	38	15 (41.7)	21 (58.3)	
IV	7	0 (0.0)	4 (100.0)	

^a Fisher's Exact Test

^b χ^2 test

x. Status unknown.

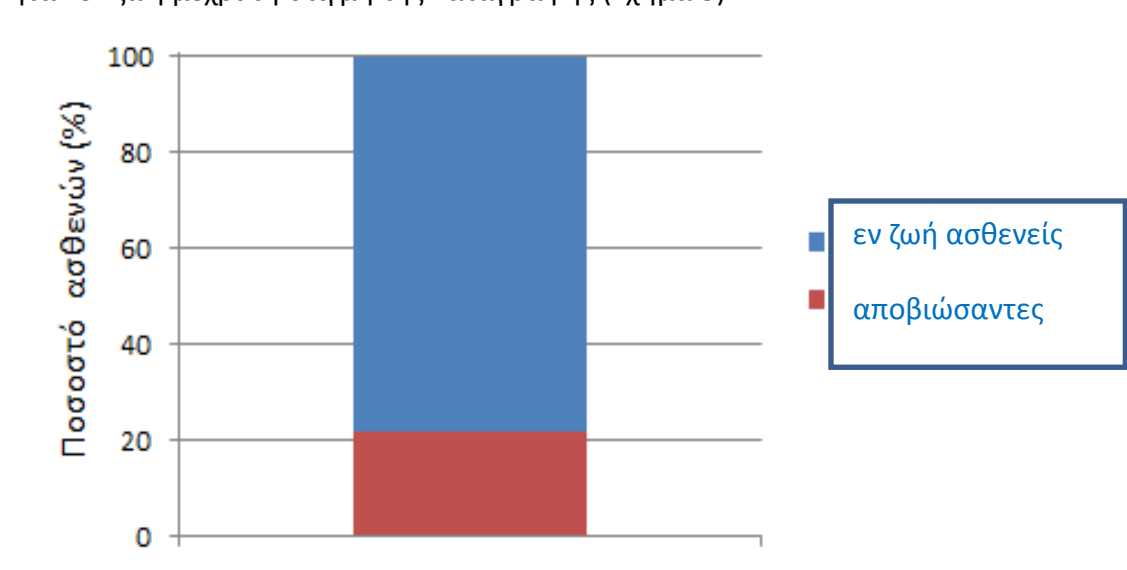
Τέλος, το σχήμα 2 μας δείχνει ότι θετική έκφραση του PRMT1 v2 σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ηλικία των ασθενών. Περισσότεροι ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας εμφανίζουν θετική έκφραση του PRMT1 v2.



Η τιμή P υπολογίσθηκε με το Mann Whitney test
 Σχήμα 2. Συσχέτιση της έκφρασης του PRMT1 v2 με την ηλικία των ασθενών

β. Συσχέτιση της έκφρασης της ισομορφής του PRMT1-v2 με την ελεύθερα νόσου επιβίωση.

Οι συσχετίσεις της έκφρασης του PRMT1-v2 με την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS), καθώς και την ολική επιβίωση (OS), τόσο στην μονοπαραγοντική και την πολυπαραγοντική ανάλυση, παρουσιάζονται στον Πίνακα 17. Χρησιμοποιήθηκαν τα στοιχεία 90 ασθενών, εκ των οποίων οι 27 απεβίωσαν ενώ οι 63 ήταν εν ζωή μέχρι τη στιγμή της καταγραφής (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Ποσοστά ασθενών που απεβίωσαν/βρίσκονταν εν ζωή, κατά τη διάρκεια της μελέτης, σε σχέση με το σύνολο των ασθενών.

Σύμφωνα με την μονοπαραγοντική ανάλυση του Cox (298) η θετική έκφραση της ισομορφής PRMT1-v2 παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση τόσο με την ελεύθερη νόσου επιβίωση (Hazard ratio= 5.46, $p=0.01$), όσο και με την ολική επιβίωση (Hazard ratio=3.38, $p=0.039$) των ασθενών. Επομένως, παρουσιάζεται η κατά 5,46 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής, όπως και η κατά 3,38 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα θανάτου σε ασθενείς με θετική έκφραση PRMT1-v2.

Σύμφωνα όμως με την πολυπαραγοντική ανάλυση του Cox η θετική έκφραση της ισομορφής PRMT1-v2 παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) (Hazard ratio= 4.55, $p=0.023$) όταν χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες η ηλικία των ασθενών και το μέγεθος των όγκων. Αντίθετα στην πολυπαραγοντική ανάλυση, λαμβάνοντας ως μεταβλητές τις προηγούμενες παραμέτρους, η θετική έκφραση της ισομορφής PRMT1-v2 δεν συσχετίζεται με την ολική επιβίωση των ασθενών. Επιπρόσθετα, όταν χρησιμοποιήθηκαν σαν μεταβλητές στην πολυπαραγοντική ανάλυση το στάδιο κατά TNM και ο βαθμός κακοήθειας, η θετική έκφραση της ισομορφής PRMT1-v2 δεν παρουσίασε συσχέτιση ούτε με την ολική επιβίωση (OS) ούτε με την ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών (DFS) (πίνακας 17).

Πίνακας 17: Συσχέτιση του PRMT1-v2 με την ολική και την ελεύθερα νόσου επιβίωση, με βάση το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης του Cox.

Μεταβλητή	Επιβίωση Ελευθέρα Νόσου			Ολική Επιβίωση		
	HR ^a	95% CI ^b	Τιμή p	HR ^a	95% CI ^b	Τιμή p
Μονοπαραγοντική ανάλυση						
PRMT1-v2						
Αρνητική έκφραση	1.00			1.00		
Θετική έκφραση	5.46	1.51-19.79	0.01	3.38	1.06-10.80	0.039
Πολυπαραγοντική ανάλυση						
PRMT1-v2^c						
Αρνητική έκφραση	1.00			1.00		
Θετική έκφραση	4.55	1.22-16.9	0.023	2.55	0.77-8.43	0.12
PRMT1-v2^d						
Αρνητική έκφραση	1.00			1.00		
Θετική έκφραση	1.87	0.35-6.24	0.58	2.13	0.63-7.23	0.22

^aHazard ratio (HR) υπολογισμένο σύμφωνα με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox

^bΔιάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval) του υπολογιζόμενου Hazard ratio

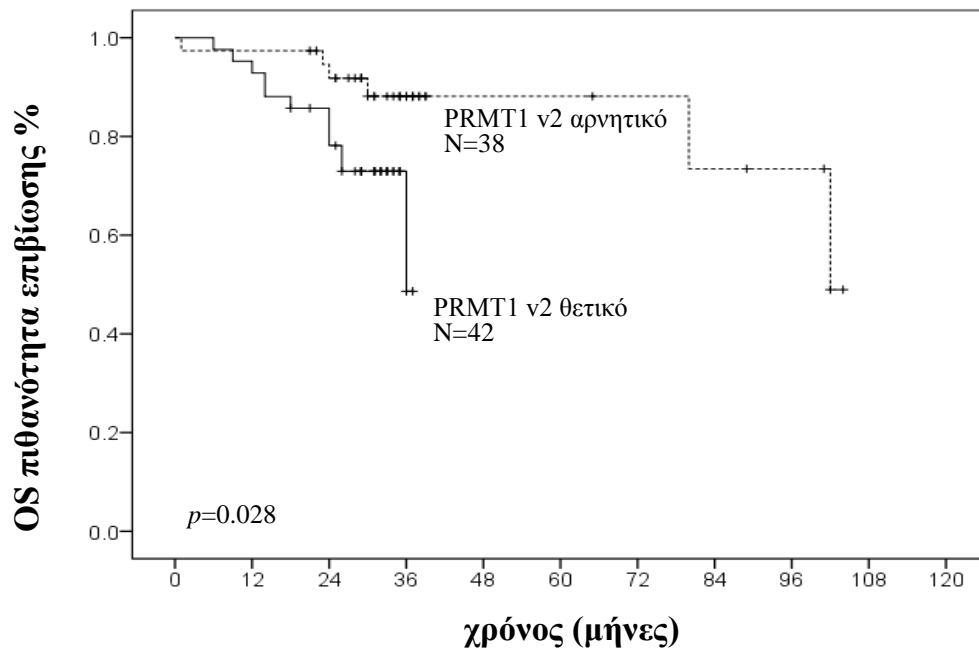
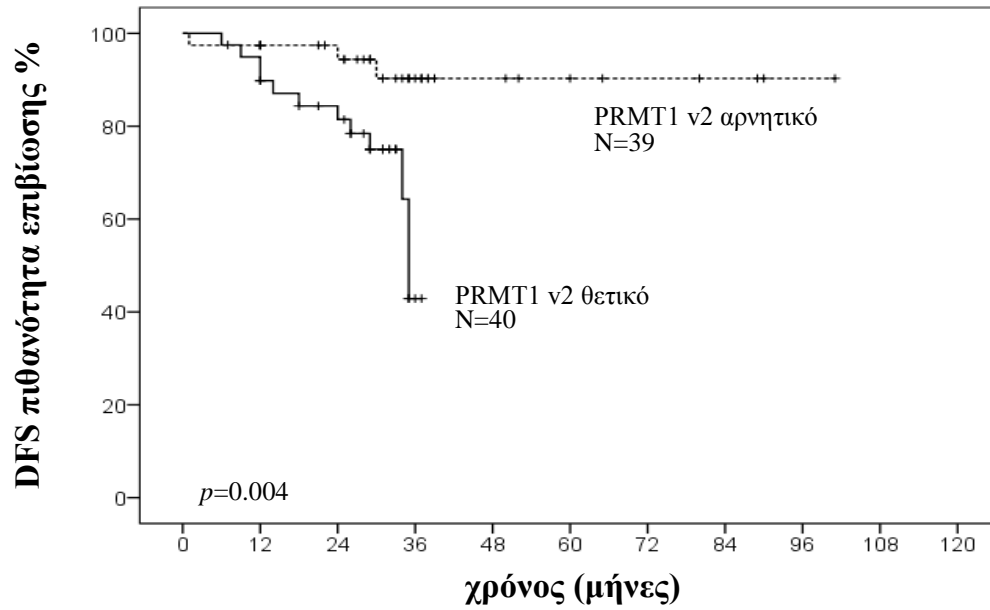
^cΓια το πολυπαραγοντικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι: ηλικία ασθενών και μέγεθος όγκου.

^dΓια το πολυπαραγοντικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι: στάδιο κατά TNM και την

ιστολογική διαβάθμιση του όγκου

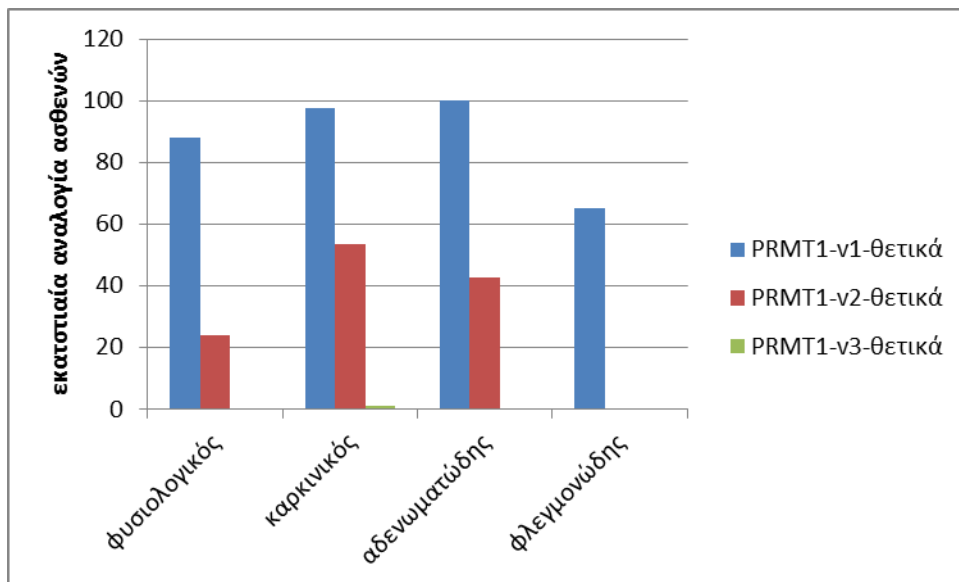
Επιπλέον, η ανάλυση επιβίωσης σύμφωνα με τη μέθοδο Kaplan-Meier έδειξε ότι η αρνητική έκφραση του PRMT1-v2 σχετίζεται με μεγαλύτερη ελευθέρα νόσου επιβίωση (DFS) ($p=0.004$) και ολική επιβίωση (OS) ($p=0.028$) (σχήμα 4).

Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης των άλλων δυο ισομορφών, PRMT1-v1 και PRMT1-v3, δεν φαίνεται να σχετίζονται σημαντικά με τον κίνδυνο υποτροπής ή θανάτου.



Σχήμα 4. Προγνωστική σημασία της έκφρασης του PRMT1-v2 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μέθοδο log rank. Οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τις περικομμένες περιπτώσεις - censored)

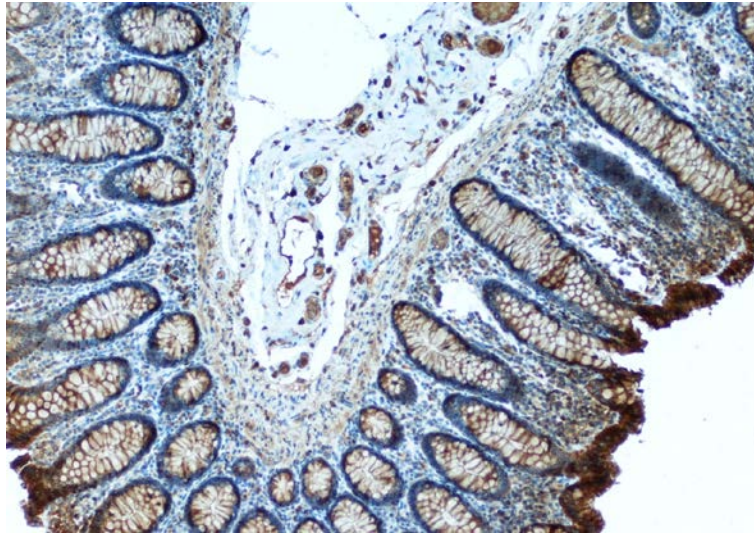
Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της ποιοτικής έκφρασης των διαφόρων ισομορφών του γονιδίου PRMT1 μπορούμε να τα παραστήσουμε γραφικά με το σχήμα 5. Σε αυτό απεικονίζεται ο αριθμός των ασθενών που εκφράζουν την κάθε ισομορφή, κάνοντας διαχωρισμό στο είδος του ιστού που μελετήθηκε. Περιλαμβάνει, δηλαδή, όχι μόνο τα καρκινικά δείγματα (θετικά), αλλά και τα μη καρκινικά, είτε αυτά είναι εντελώς φυσιολογικά είτε πρόκειται για άλλες παθολογικές καταστάσεις που αφορούν το παχύ έντερο (αδενώματα, ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα).



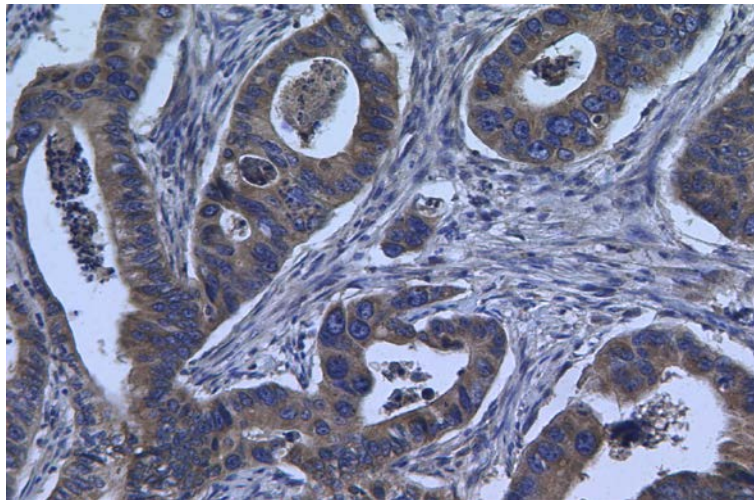
Σχήμα 5: Συγκεντρωτικός πίνακας έκφρασης των 3 ισομορφών του PRMT1 σε διάφορες κατηγορίες εντερικού ιστού.

γ. Εντοπισμός της PRMT1 πρωτεΐνης σε κυτταρικό επίπεδο

Σε επιλεγθέντα δείγματα καρκινωμάτων και φυσιολογικού ιστού έγινε χρώση με αντίσωμα έναντι του PRMT1. Το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του PRMT1 ελέχθηκε για την ικανότητα πρόσδεσής του στο αντιγόνο με τη χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά western. Η χρώση, τόσο σε φυσιολογικούς (εικόνα 18) όσο και σε καρκινωμάτους ιστούς (εικόνα 19), ήταν πολύ έντονη στο κυτταρόπλασμα και μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις εντοπιζόταν στην πυρηνική περιοχή.



Εικόνα 18: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης PRMT1 σε φυσιολογικό ιστό του παχέος εντέρου (μεγέθυνση x125)



Εικόνα 19: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης PRMT1 σε καρκινωματώδη ιστό του παχέος εντέρου (μεγέθυνση x150)

Συμπερασματικά λοιπόν μπορούμε να πούμε ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, κατά κύριο λόγο, ανεξάρτητα του αν αυτά είναι φυσιολογικά ή καρκινωματώδη και ανεξάρτητα από το είδος του ιστού που μελετάμε.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη κακοήθειας στο εντερικό επιθήλιο ή το κυτταρικό στρώμα που καλύπτει τον εντερικό αυλό. Υπάρχουν αρκετά μορφολογικά και μοριακά στοιχεία, τα οποία συγκλίνουν στο ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου αναπτύσσεται μέσω αρκετών πρόδρομων σταδίων. Τα στάδια αυτά διακρίνονται ιστολογικά και ποικίλουν από την υπερπλασία μέχρι διάφορα καλοήθη αδενώματα και από το τοπικά διηθητικό καρκίνωμα μέχρι τη συστηματική μεταστατική νόσο (5).

Η ανάπτυξη όγκων μπορεί να επιτευχθεί μέσω μιας πληθώρας διαφορετικών μηχανισμών, και ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί ένα εξαιρετικό τέτοιο παράδειγμα. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ο καρκίνος του παχέος εντέρου ξεκινάει με την παρουσία γενετικών αλλαγών που αφορούν τα μονοπάτια Wnt (Wingless) και Hh (Hedgehog), εφόσον και τα δύο αυτά μεταβολικά μονοπάτια αφορούν την παραγωγή εκκριτικών πρωτεϊνών – σιγνάλων (300). Η παρουσία διάφορων κληρονομικών συνδρόμων καρκίνου αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στο έντερο λίγο ή πολύ ειδικά. Τέτοια σύνδρομα αποτελούν η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP), ο κληρονομικός ορθοκολικός καρκίνος που δε σχετίζεται με πολύποδες (HNPCC), το σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS) και η ασθένεια του Cowden. Επίσης, στην πρόοδο του καρκίνου συμμετέχουν μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το γονίδιο KRAS, οι οποίες προκαλούν απώλεια της λειτουργίας του TP53 και απενεργοποίηση της κυτταρικής απόκρισης στον TGF (5). Τέλος, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η υπερβολική κατανάλωση κόκκινου κρέατος, καθώς και η ηλικία του ατόμου, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης είναι μία βασική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που φαίνεται να ρυθμίζει μια ποικιλία από κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταγωγή σήματος, ο μεταβολισμός του RNA, η δομή της χρωματίνης. Η τροποποίηση αυτή εμφανίζεται συχνά στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και μία βασική οικογένεια πρωτεϊνικών μορίων που πραγματοποιεί αυτή τη τροποποίηση είναι οι πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης (Protein Arginine Methyltransferases, PRMTs.) Η πρωτεϊνική μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης 1 (PRMT1) είναι η κυριότερη πρωτεϊνική μεθυλοτρανσφεράση στα ανθρώπινα κύτταρα. Οι βασικότεροι στόχοι της PRMT1 περιλαμβάνουν τα στοιχεία των hnRNPs (301), την ιστόνης H4 (302) και τον PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) (240).

Οι PRMTs εκφράζονται ευρέως (εκτός από την PRMT8), εντοπίζονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, και μεθυλιώνουν τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Συνεπώς, οι αλλαγές στη ρύθμιση αυτών των ενζύμων και των υποστρωμάτων τους είναι πιθανό να συμμετέχουν στην παθογένεια αρκετών ασθενειών. Είναι σαφές ότι οι PRMTs δεν είναι μόνο επιγενετικοί ρυθμιστές, καθώς η μεθυλαργινίνη ρυθμίζει τη συνθετάση του νιτρικού οξέος, και οι ιικές πρωτεΐνες μεθυλιώνονται ισχυρά.

Οι PRMTs είναι υπεύθυνες για την καταστολή της NOS. Η NOS παίζει πολλαπλούς ρόλους στον καρδιαγγειακό σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα, και ως

νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο. Η ADMA και MMA είναι ενδογενή αμινοξέα που καταστέλλουν τη NOS. Η διαταραχή στην ισορροπία της ADMA και MMA, εξαιτίας δυσλειτουργίας της PRMT1, αυξάνει το ρίσκο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι PRMTs εμπλέκονται στην ιική παθογένεση, καθώς έχει βρεθεί ότι πολλές ιικές πρωτεΐνες μεθυλιώνονται από τις PRMTs. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η NSB πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας C, η EBNA2 (Epstein-Barr virus nuclear antigen 2), και οι πρωτεΐνες Rev και Tat του HIV-1. Οι ιικές πρωτεΐνες φαίνεται πως μεθυλιώνονται είτε από την PRMT1 ή από τη PRMT6 και η μεθυλίωσή τους αυξάνει την πολυπλοκότητα τους και επεκτείνει τη γκάμα των αλληλεπιδράσεων τους, παρακάμπτοντας έτσι τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες.

Όπως είναι γνωστό, οι αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων είναι ισχυρά συσχετισμένες με τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια συμμετέχουν σε αναπτυξιακές διεργασίες και σε γεγονότα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως τα MLH1, MLH2, TP53 και LKB1, όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Παρόλο που ο φυσιολογικός ρόλος του PRMT1 δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, υπάρχουν διάφορες υποθέσεις. Μεταξύ άλλων, το ένζυμο αυτό φαίνεται να σχετίζεται με τον καρκίνο.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου PRMT1 και εξετάστηκε ο πιθανός ρόλος του PRMT1 ως ενός νέου πιθανού βιοδείκτη για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Στα δείγματα που συλλέχθηκαν δε λήφθηκε υπόψη η θέση εμφάνισης του καρκίνου, δηλαδή αν το δείγμα προέρχεται από το ανιόν ή το κατιόν κόλον. Η επιλογή αυτή έγινε, γιατί, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν κάποια επιδημιολογικά δεδομένα που συνδέουν τη θέση του καρκινώματος με το είδος του συνδρόμου (π.χ. HNPCC ή FAP), τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα μελετών είναι κάπως αντικρουόμενα (303).

Ένεκα εναλλακτικού ματίσματος του πρόδρομου mRNA, που προκύπτει από τη μεταγραφή του PRMT1, προκύπτουν τρεις ισομορφές που έχουν χαρακτηριστεί ως v1, v2 και v3 (82, 90).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε από τη μελέτη της έκφρασης του PRMT1, έδειξε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του PRMT1-v2 και των κλινικών και ιστολογικών δεδομένων από τους όγκους. Εν πρώτοις, η έκφραση της ισομορφής v2 φαίνεται ότι αυξάνεται ακολουθώντας την εξέλιξη από φυσιολογικό ιστό σε αδένωμα και τελικά σε καρκίνο. Η ισομορφή v2 εκφράζεται στατιστικά σημαντικά λιγότερο σε φλεγμονώδεις ιστούς με IΦNE σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης ισομορφής είναι σημαντικά αυξημένα, με στατιστικά σημαντικό τρόπο, σε ιστούς καρκίνου παχέος εντέρου συγκριτικά με τα αντίστοιχα σε φυσιολογικούς ιστούς. Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω συμπεράσματα, η θετική έκφραση του PRMT1-v2 φαίνεται να είναι ενδεικτική της εξέλιξης της νόσου και της επιθετικότητας. Είναι φανερό ότι όσο υψηλότερος είναι ο βαθμός της κακοήθειας, τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό θετικής έκφρασης της ισομορφής- v2. Επιπρόσθετα, τόσο το προχωρημένο TNM στάδιο και η παρουσία θετικών λεμφαδένων συνδέονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο με τη θετική έκφραση της ισομορφής PRMT1-v2. Ωστόσο, με το κατά Duke's στάδιο καρκίνου δεν ανευρέθη καμία συσχέτιση της έκφρασης του PRMT1-v2. Στατιστικά σημαντική σχέση προέκυψε

και μεταξύ της ηλικίας των ασθενών και της έκφρασης της ισομορφής PRMT1-v2: οι ηλικιωμένοι ασθενείς εμφάνιζαν σε μεγαλύτερο βαθμό θετική έκφραση του γονιδίου. Η ανάλυση επιβίωσης έγινε τόσο με το μοντέλο παλινδρόμησης αναλογικών κινδύνων Cox όσο και με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Η μονοπαραγοντική ανάλυση Cox έδειξε ότι οι ασθενείς που εκφράζουν θετικά την ισομορφή PRMT1-v2 παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα για υποτροπή ($p=0.01$) ή θάνατο ($p=0.032$), σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εκφράζουν την ισομορφή. Η πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης Cox, συμπεριλαμβάνοντας σαν μεταβλητές την ηλικία των ασθενών και το μέγεθος του όγκου, έδειξε ότι η θετική έκφραση του PRMT1-v2 σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής των ασθενών ($p=0.023$), αλλά όχι και της ολικής επιβίωσης αυτών. Η ίδια ανάλυση, όταν ελήφθησαν ως παράγοντες το TNM στάδιο της νόσου ή ο βαθμός κακοήθειας, έδειξε ότι δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση μεταξύ θετικής έκφρασης της ισομορφής PRMT1-v2 και της υποτροπής ή του θανάτου των ασθενών.

Όσον αφορά τις άλλες δύο ισομορφές, η συσχέτιση μεταξύ των προτύπων έκφρασής τους και άλλων παραμέτρων δεν είναι ισχυρή. Τόσο για την ισομορφή PRMT1-v1 όσο και για την ισομορφή PRMT1-v3, τα επίπεδα έκφρασής τους δεν συσχετίστηκαν σημαντικά ούτε με κίνδυνο υποτροπής ούτε με κίνδυνο θανάτου.

Σχετικά με τα αδενώματα, δεν καταγράφηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό και για τις 3 ισομορφές του PRMT1 ενώ για τα ΙΦΝΕ καταγράφηκε μειωμένη- με στατιστικά σημαντικό τρόπο - έκφραση του PRMT1-v2 στους φλεγμονώδεις σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς.

Περίπου, 10-30% των ανθρώπινων γονιδίων που παρουσιάζουν εναλλακτικό μάτισμα έχουν ιστοειδικές ισομορφές, λαμβάνοντας υπόψη ότι 316 γονίδια έχει δειχθεί ότι έχουν ισομορφές που σχετίζονται με τον καρκίνο (295). Η παραγωγή εναλλακτικών ισομορφών μπορεί να είναι μια συνέπεια της νόσου, όπως ο καρκίνος (294).

Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου PRMT1 εξακολουθεί να βρίσκεται υπό έντονη μελέτη και αποτελεί αντικείμενο διαφωνίας ως προς τον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Υπάρχουν πολλά πράγματα που πρέπει να οριστούν και να αποσαφηνιστούν. Ένα από αυτά είναι η συμπεριφορά της πρωτεΐνης στο κύτταρο. Σύμφωνα με τους Tang et al. (1998) η πρωτεΐνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα και ελάχιστα στο κυτταρόπλασμα (83). Μεταγενέστερα, οι Araya et al. (2005) υποστήριξαν την έντονη παρουσία της στο κυτταρόπλασμα και τη διαρκή μετακίνηση του μορίου μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (304). Μια ακόμα μελέτη του 2005, από τους Herrmann et al., η οποία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HEK293 (ανθρώπινα εμβρυονικά κύτταρα νεφρού) ισχυρίζεται την πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα (6 φορές περίπου μεγαλύτερη από ό,τι στον πυρήνα), γεγονός, όμως, που εξαρτάται από την παρουσία μη μεθυλιωμένων υποστρωμάτων (180). Τα αντικρουόμενα αυτά στοιχεία μπορούν να ερμηνευθούν από το γεγονός ότι σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, οι πρωτεΐνες που έχουν ανάγκη της μεθυλίωσης μπορεί να ποικίλουν τόσο σε ποσότητα όσο και σε ποιότητα, όπως επίσης και σε διάφορες ισομορφές ανά τύπο ιστού (ιστική έκφραση). Ως αποτέλεσμα, οι μεθυλοτρανσφεράσες αναμένεται να λειτουργούν είτε στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα, ανάλογα με τον εντοπισμό των υποστρωμάτων τους.

Η μελέτη που πραγματοποιήσαμε για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία, σε φυσιολογικούς και καρκινωματώδεις ιστούς παχέος εντέρου, έδειξε ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η παρουσία της στον πυρήνα είναι σπάνια. Το ίδιο μοτίβο παρατηρήθηκε στον ιστό του καρκίνου του μαστού, του οποίου τα καρκινικά κύτταρα είναι επίσης επιθηλιακά (305). Είναι αρκετά περίεργο για ένα ένζυμο που μεθυλιώνει υπολείμματα αργινίνης κυρίως σε πυρηνικές πρωτεΐνες να βρεθεί σε τέτοιο βαθμό στο κυτταρόπλασμα. Αυτό θα μπορούσε πιθανώς να αποδοθεί στο γεγονός ότι η μεθυλίωση συμβαίνει κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά τη μετάφραση, συνεπώς το ένζυμο πρέπει να διαμένει στο κυτταρόπλασμα. Ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται από την πρωτεΐνη για να βγει από τον πυρήνα και για να εξακολουθεί να είναι σε θέση να επιστρέψει είναι ακόμα άγνωστος. Πειράματα από τον Herrmann et al. (2005) αναφέρουν ότι η PRMT1 έχει τη δυνατότητα να μετακινηθεί μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, ίσως πάνω στα αμεθυλίωτα υποστρώματα που τη μεταφέρουν μέσω του πυρηνικού πόρου (180). Αυτό το επιβεβαιώσαμε για το εντερικό επιθήλιο, αφού παρατηρήσαμε ότι η PRMT1 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα. Δυστυχώς, βέβαια, είχαμε τη δυνατότητα δημιουργίας μόνον πολυκλωνικών αντισωμάτων. Η παραγωγή και χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του PRMT1 θα βοηθούσε σε μια ενδελεχέστερη μελέτη του κυτταρικού εντοπισμού της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Τα δεδομένα από τη μελέτη αυτή δείχνουν ότι η έκφραση της ισομορφής v2 του γονιδίου PRMT1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της δυσμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Μελέτες σχετικά με τη φυσιολογική λειτουργία της PRMT1 σε φυσιολογικό παχύ έντερο θα ρίξει περισσότερο φως στο ρόλο του ενζύμου αυτού στον καρκίνο, καθώς και σε άλλες ασθένειες. Το PRMT1 γονίδιο σε συνδυασμό με άλλους δείκτες θα μπορούσε να αποδειχθεί χρήσιμο για τους γιατρούς. Παρόλα αυτά, μια πιο εκτεταμένη μελέτη είναι απαραίτητη για την ανάδειξη ενός ρόλου της PRMT1 ως ενός πιθανού βιολογικού προγνωστικού δείκτη ή θεραπευτικού στόχου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος συνιστά ένα εξαιρετικά σημαντικό πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο αφού αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ειδικότερα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) έχει συσχετισθεί με το δυτικό τρόπο ζωής και διατροφής. Το γεγονός ότι περισσότερο από ένα εκατομμύριο νέα περιστατικά ΚΠΕ διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο καθιστά την ανάπτυξη βιολογικών δεικτών ιδιαίτερα χρήσιμη τόσο για την έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση όσο και για την ανακάλυψη και εισαγωγή νέων θεραπευτικών επιλογών και προσεγγίσεων. Αυτό αποτέλεσε και το βασικό κίνητρο για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Το βιολογικό υπόβαθρο της καρκινικής νόσου του παχέος εντέρου έχει μελετηθεί αρκετά και συνεχίζει να μελετάται. Υφίστανται, πάραυτα, γονίδια τα οποία παρότι φαινομενικά δεν συσχετίζονται με αυτό τον τύπο καρκίνου, μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την πρόοδο της νόσου.

Ένα τέτοιο γονίδιο θεωρήθηκε ότι είναι κι αυτό της πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης 1 (PRMT1). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε ποικίλα και σημαντικά σημεία του κυτταρικού μεταβολισμού, μέσω της μεθυλίωσης καταλοίπων αργινίνης συγκεκριμένων μορίων. Η συμμετοχή του πρωτεϊνικού προϊόντος του PRMT1 στον μεταβολισμό έδωσε την ώθηση στο να μελετηθεί και να συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η παρούσα μελέτη αφορά τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του PRMT1 σε ιστούς ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του παχέος εντέρου, ιστούς προερχόμενους από αδενώματα και ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του παχέος εντέρου, καθώς και φυσιολογικούς ιστούς του παχέος εντέρου. Κατά τη συσχέτιση της έκφρασης με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους προέκυψε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των παραμέτρων και της έκφρασης ενός εκ των τριών εναλλακτικών ισομορφών του PRMT1, του v2. Ειδικότερα, η έκφραση της ισομορφής v2 φάνηκε να αυξάνεται κατά την εξέλιξη από φυσιολογικό ιστό σε αδένωμα και καρκίνο. Παρατηρήθηκε να είναι αυξημένη σε ιστούς καρκίνου παχέος εντέρου σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς, ευρήματα που πιθανόν δείχνουν ότι η θετική έκφραση του PRMT1-v2 είναι ενδεικτική της εξέλιξης και της επιθετικότητας της νόσου. Αντίθετα, σε φλεγμονώδεις ιστούς με ΙΦΝΕ, η έκφραση του PRMT1-v2 ήταν μειωμένη συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς. Το προχωρημένο TNM στάδιο ($p=0.026$), ο βαθμός κακοήθειας του όγκου ($p=0.015$), η παρουσία θετικών λεμφαδένων ($p=0.016$) και η ηλικία των ασθενών ($p=0.004$) συνδέονταν με στατιστικά σημαντικό τρόπο με την θετική έκφραση της ισομορφής PRMT1-v2 (οι ηλικιωμένοι ασθενείς εμφάνιζαν σε μεγαλύτερο βαθμό θετική έκφραση του γονιδίου).

Επιπρόσθετα, η μονοπαραγοντική ανάλυση Cox έδειξε ότι οι ασθενείς που εκφράζουν θετικά την ισομορφή PRMT1-v2 παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα για υποτροπή ($p=0.01$) ή θάνατο ($p=0.032$) σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εκφράζουν τη συγκεκριμένη ισομορφή ενώ η θετική έκφραση της ισομορφής PRMT1-v2 παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση τόσο με την ελεύθερης νόσου επιβίωση ($p=0.01$), όσο και με την ολική επιβίωση ($p=0.039$) των ασθενών. Η πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης

Cox, συμπεριλαμβάνοντας σαν μεταβλητές την ηλικία των ασθενών και το μέγεθος του όγκου, έδειξε ότι η θετική έκφραση του PRMT1-v2 σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής των ασθενών ($p=0.023$), αλλά όχι και με την ολική επιβίωση αυτών. Για τις ισομορφές PRMT1-v1 και v3 δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Όσον αφορά τα αδενώματα, και για τις 3 ισομορφές PRMT1, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό ενώ στα ΙΦΝΕ καταγράφηκε μειωμένη - με στατιστικά σημαντικό τρόπο - έκφραση του PRMT1-v2 στους φλεγμονώδεις σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ($p=0.021$). Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της πρωτεΐνης, με αντίσωμα που φτιάχτηκε στο εργαστήριό μας, και υπέδειξαν την κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματική παρουσία της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συγκλίνουν προς τον χαρακτηρισμό της υψηλής έκφρασης της ισομορφής v2 του γονιδίου PRMT1 ως δείκτη κακής πρόγνωσης όσον αφορά τους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.

SUMMARY

Cancer consists a major Public Health issue worldwide as it is recognized as the second most common cause of death, behind cardiovascular diseases. In particular, colorectal cancer has been associated with the western life-style and dietary habits. The fact that more than one million cases of colorectal cancer are diagnosed worldwide each year, make the discovery of new biological markers more imperative and necessary, not only for diagnostic and prognostic purposes, but also for the development and introduction of new therapeutic approaches. This has been the main motive for the designing and working out of the present thesis.

The biological background of colon cancer disease has already been studied extensively and is under continuous consideration. Nevertheless, there are many genes, that although they are not directly connected to colon cancer, they could offer a great deal of information on the disease progression. Protein Arginine Methyltransferase 1 gene (PRMT1) was thought to be one of them. This gene encodes an enzyme implicating in many important aspects of cell metabolism via arginine methylation of certain protein molecules. PRMT1's participation in metabolism made us consider studying this molecule and correlating its expression to colon cancer.

In the present study, the expression levels of PRMT1 splice variants were analyzed in a variety of colon tissues (normal, cancerous, adenomas, inflammatory disease tissue). In the course of our study, we were also able to correlate the expression levels of PRMT1 with clinical and pathological parameters and we found that PRMT1-v2 was the only PRMT1 variant associated in a statistically significant manner with all clinicopathological parameters examined. More specifically, PRMT1-v2 expression seemed to increase during the progression process from normal tissue to adenoma and finally carcinoma, whereas it was definitely increased colon cancer tissues versus normal tissues. On the contrary, in inflammatory (IBD) colon tissues, PRMT1-v2 expression was decreased

versus normal tissues. These findings probably reveal that the positive expression of PRMT1-v2 is indicative of the progression and aggressiveness of the colon cancer disease. Advanced TNM stage ($p=0.026$), tumor grade ($p=0.015$) as well as positive nodal status ($p=0.016$) and patients' age ($p=0.004$) were associated in a statistically significant manner with the positive expression of PRMT1-v2 (the percentage of patients expressing PRMT1 v2 was substantially higher in older patients compared to younger ones). Additionally, according to Cox univariate analysis, positive expression of PRMT1-v2 seemed to associate with a higher probability for patients' relapse ($p=0.01$) or death ($p=0.032$) and correlate, also, with a statistically significant manner with OS ($p=0.039$) and DFS ($p=0.01$). As far as the other two isoforms (PRMT1-v1 and PRMT1-v3) are concerned, no statistically significant difference in expression analysis was recorded between normal and cancerous tissue. All three PRMT1 isoforms (v1, v2 and v3) did not differ concerning their expression, in a statistically significant manner, in adenomas in comparison with normal tissue whereas in IBDs, PRMT1-v2 showed lower expression in inflammatory versus normal tissue ($p=0.021$). On the other hand, multivariate analysis showed a statistically significant association between the positive expression of PRMT1-v2 and patients' relapse ($p=0.023$). Moreover the experiments of immunohistochemical localization of the PRMT1 protein, using an in-house produced anti-PRMT1 antibody, indicated a mainly cytoplasmic presence.

The results of this study converge to the characterization of the high expression of PRMT1-v2 as a marker of unfavorable prognosis for colon cancer patients.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΕΠΟΕ (Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων - Ογκολόγων Ελλάδας). Κλινική Ογκολογία 2007. Γενικό Μέρος (τόμος Α΄).
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York , Garland Publishing, c2002.
3. Paparolychroniadis C. Environmental and other risk factors for colorectal carcinogenesis. Tech Colorectol 2004; 8: 7-9.
4. Παπαζήσης Κ. Καρκινικός μετασχηματισμός ευκαρυωτικού κυττάρου. Βιολογία του καρκίνου (Εκπαιδευτική σειρά Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας) 2007, τεύχος 1, Κεφ. 5, σελ.53-65.
5. Schulz WA. Molecular Biology of Human Cancers. Springer Science, c 2005.
6. Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, c2001
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York.
8. Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darell JE. Molecular Cell Biology. New York, WH Freeman and Co, c 1999.
9. Δελτίο τύπου Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας 2003. Διαθέσιμο στην ιστοσελίδα: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>.
10. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. Molecular cancer 2007; 6: 25).
11. Kufe Donald W, Pollock Raphael E, Weichselbaum Ralph R, Bast Robert C, Gansler Ted S, Holland James F, Frei III Emil. Cancer Medicine. 6th ed. Hamilton (Canada), BC Decker Inc, c 2003.
12. American Cancer Society 2005. Colorectal Cancer facts and figures special edition. Atlanta : American Cancer Society, 2005.
13. Feldman M, Friedman L, Brandt L. Sleisinger and Fordtran’s Gastrointestinal and Liver Diseases 2010. 9th ed.
14. Cappell M. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. Gastroenterol Clin N Am 2008; 37: 1-24
15. Van Cutsem EJD, Oliveira J. Colon cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. Annals of Oncology 2008; 19(2): 29-30.
16. Liong Min-Tze. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and In-Vivo Evidence. Int. J. Sci. 2008; 9: 854-63.
17. Kushi L, Giovannucci E. Dietary Fat and Cancer. The American Journal of Medicine 2002; 113(9B): 63-70).
18. Ryan-Harshmann M, Aldoori W. Diet and colorectal cancer. Canadian Family Physician 2007; 53: 1913-1920.

19. Chan A, Giovannucci E. Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2029-43.
20. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971; 28: 3-13.
21. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, Wolk A. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 525-33.
22. Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *Br Med J* 1976; 273(ii): 1525-36.
23. Marshall J. Prevention of Colorectal Cancer: Diet, Chemoprevention, and Lifestyle. *Gastroenterology Clinics of North America* 2008: 73 – 82.
24. Giovannucci E, Wu K. Cancers of the colon and rectum. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. *Cancer epidemiology and prevention*. 3rd edition. New York: Oxford; 2006: 809-29.
25. Martinez EM, Heddens D, Earnest DL et al. Physical activity, body mass index, and prostaglandin E2 levels in rectal mucosa. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(11): 950-3.
26. Κοσμίδης Π, Τριανταφυλλίδης Γ. Ογκολογία του πεπτικού συστήματος (1991).
27. Baxter N, Tepper J, Durham J, Rothenberger D, Virnig B. Increased Risk of Rectal Cancer After Prostate Radiation: A Population-Based Study. *Gastroenterology* 2005; 128: 819-24.
28. Levin K, Dozois R. Epidemiology of Large Bowel Cancer. *World J Surg* 1991; 15: 562 – 67.
29. Konda A, Duffy M. Surveillance of patients at increased risk of colon cancer bowel disease and other conditions. *Gastroenterology Clinics of North America* 2008; 37(1): 191 – 213.
30. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A et al. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 2006; 9: 199-207.
31. Larsson S, Orsini N, Wolk A. Diabetes Mellitus and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(22): 1679-87.
32. Patel P, Hanson D, Sullivan P et al. Incidence of Types of Cancer among HIV-infected Persons Compared with the General Population in the United States, 1992-2003. *Ann Intern Med* 2008; 148(10): 728-36.
33. Grulich AE, van Leeuwen MT et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet* 2007; 370(9581): 59-67.
34. Mutch M. Molecular Profiling and Risk Stratification of Adenocarcinoma of the Colon. *J Surg Oncol* 2007; 96: 693-703.
35. Karlinger K, Gyorke T et al. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiology* 2000; 35: 154-67.
36. Τσιαμούλος Ζ.Π., Καραμανώλης Γ.Π. Βασικές θεωρίες στην παθογένεση των ΙΦΝΕ / Μυλωνάκη Μ. Παθογένεση – Διάγνωση. Υπάρχει κάτι νεώτερο? Βιβλίο ομιλιών και περιλήψεων: 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου 2008.
37. Friedman S, McQuaid K, Grendell J. *Current Diagnosis & Treatment in Gastroenterology* 2nd ed.
38. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 138: 2089-2100.
39. Makinen M J. Colorectal serrated adenoma. *Histopathology* 2007; 50: 131-150.

40. Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 351-73.
41. Τριμπόνιας Γ, Πασπάτης Γ. Προληπτικός έλεγχος για καρκίνο παχέος εντέρου: σε ποιους, πότε και πόσο συχνά. *Ευεξία και διατροφή* 2010; 45: σελ. 6-9.
42. Liang J, Alrawi S, Tan D. Nomenclature, Molecular Genetics and Clinical Significance of the Precursor Lesions in the Serrated Polyp Pathway of Colorectal Carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2008; 1: 317-24.
43. Salama P, Platell C. Colorectal cancer stem cells. *ANZ J Surg* 2009; 79: 697-702).
44. Blanes A, Diaz-Cano SJ. Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 2006; 12(37): 5932-40.
45. Saif Wasif M, Chu E. Biology of Colorectal Cancer. *The Cancer Journal* 2010; 16(3): 196-201.
46. Boman B, Huang E. Human Colon Cancer Stem Cells: A New Paradigm in Gastrointestinal Oncology. *JCO* 2008; 26(17): 2828-38.
47. Ricci-Vitiani L, Fabrizio E et al. Colon cancer stem cells. *J Mol Med* 2009; 87: 1097-1104.
48. Todaro M, Francipane MG et al. Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy. *Gastroenterology* 2010; 138: 2151-62.
49. Pino M, Chung D. The Chromosomal instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2059-72.
50. Jiang Y, Kimchi E et al. Assessment of K-ras Mutation. *Cancer* 2009 : 3609-17.
51. Boland R, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2073-87.
52. Watanabe T, Muto T. Colorectal Carcinogenesis Based on Molecular Biology of Early Colorectal Cancer, with Special Reference to Nonpolypoid (Superficial) Lesions. *World J Surg* 2000; 24: 1091-97.
53. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2101-14.
54. Jasperson K, Tuohy T, Neklason D, Burt R. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2044-58.
55. Beggs ad, Latchford AR et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* 2010; 59; 975-86.
56. www.cancer.org
57. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2008;61: 561-69.
58. Tejpar S. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2007; 21(6): 1071-87.
59. Compton C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *Mod Pathol* 2003; 16(4): 376-88.
60. Kim YI, Pogribny I, Basnakian A et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 46-52.
61. Park SY, Nomura AMY et al. Carotenoid Intake and Colorectal Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *J Epidemiol* 2009; page 1-9.

62. Harris RE, Beebe-Donk J, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep* 2005;13(4): 559-83.
63. Half E, Arber N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opin. Pharmacother.* 2009; 10(2): 211-19.
64. Lieberman D. Progress and Challenges in Colorectal Cancer Screening and Surveillance. *Gastroenterology* 2010; 138: 2115-26.
65. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC et al. American College of Gastroenterology Guidelines for Colorectal Cancer Screening 2008. *The American Journal of Gastroenterology* 2009; 104: 739-50.
66. Goodwin R, Asmis T. Overview of Systemic Therapy for Colorectal Cancer. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22(4): 251-6.
67. Chee C, Sinicrope F, Targeted Therapeutic Agents for Colorectal Cancer. *Gastroenterol Clin N Am* 2010; 39: 601-13.
68. Αυγερινός Α. Ογκολογική αντιμετώπιση του ασθενή με καρκίνο του παχέος εντέρου και απομακρυσμένες μεταστάσεις. 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 2010. Τόμος πρακτικών σελ. 110 -115.
69. Lea M. Recently identified and potential targets for colon cancer treatment. *Future Oncol* 2010; 6(6): 993-1002.
70. Rex DK, Kahi CJ, Levin B et al. Guidelines for Colonoscopy Surveillance after Cancer Resection: A Consensus Update by the American Cancer Society and US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 160-7.
71. Clarke S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 977-983.
72. Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ. Protein methylation: a signal event in post-translational modification *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 89-91.
73. Najbauer J, Orpizewski J, Aswad DW. Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in vivo *Biochem* 1996; 35: 5183-5190.
74. Kakimoto Y, Matsuoka Y, Miyake M, Konishi H. Methylated amino acid residues of proteins of brain and other organs. *J Neurochem* 1975; 24: 893.
75. Paolantonacci P, Lawrence F, Lederer F, Robert-Gero M. Protein methylation and protein methylases in *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 21: 47.
76. Yarlett N, Quamina A, Bacchi CJ. Protein methylases in *Trypanosoma brucei brucei*: activities and response to DL-alpha-difluoromethylornithine. *J Gen Microbiol* 1991; 137 : 717.
77. Bedford M. T. and Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* 2005; 18: 263-272.
78. Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 1998; 61: 65-131.
79. Zobel-Thropp P, Gary JD, Clarke S. delta-N-methylarginine is a novel posttranslational modification of arginine residues in yeast proteins *J Biol Chem* 1998; 273: 29283-29286.

80. Cecilia I. Zurita-Lopez, Troy Sandberg, Ryan Kelly, and Steven G. Clarke Human Protein Arginine Methyltransferase 7 (PRMT7) Is a Type III Enzyme Forming ω - N^6 -Monomethylated Arginine Residues. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 7859-7870.
81. Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR. The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 1996; 271: 15034-15044.
82. Scott HS, Antonarakis SE, Lalioti MD, Rossier C, Silver PA, Henry MF. Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics* 1998; 48: 330-340.
83. Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR. PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation *J Biol Chem* 1998; 273: 16935-16945.
84. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 1999; 284: 2174-2177.
85. Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 31531-31542.
86. Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem* 2002; 277: 353-3543.
87. Miranda TB, Miranda M, Frankel A, Clarke S. PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with distinct substrate specificity. *J Biol Chem* 2004; 279(22): 22902-22907.
88. Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 2005; 280(38): 32890-32896.
89. Cook, J. R., Lee, J. H., Yang, Z. H., Krause, C. D., Herth, N., Hoffmann, R. and Pestka, S. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 342: 472-481.
90. Scorilas, A., Black, M.H., Talieri, M., and Diamandis, E.P. Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 278: 349-359.
91. Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., and Ruley, H.E. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20, 4859-4869.
92. Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, M.C., Aldaz, C.M., and Bedford, M.T. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 6464-6468.
93. Kim, J.K., Lee, J., Yadav, N., Wu, Q., Carter, C., Richard, S., Richie, E., and Bedford, M.T. Loss of CARM1 results in hypomethylation of TARPP and deregulated early T cell development. *J. Biol. Chem.* 2004; 24: 25339-25344.

94. Markus A. Kleinschmidt, Petra de Graaf, Hetty A. A. M. van Teeffelen, H. Th. Marc Timmers. Cell Cycle Regulation by the PRMT6 Arginine Methyltransferase through Repression of Cyclin- Dependent Kinase Inhibitors. *PLOS ONE* 2012; 7.
95. Clarke, S.G., and Tamanoi, F., eds. Protein Methyltransferases. *The Enzymes 2006, Third Edition, Volume XXIV* (San Diego, CA: Academic Press).
96. Paik, W.K., and Kim, S. Natural occurrence of various methylated amino acid derivatives. In *Protein Methylation*, A. Meister, ed. (New York: John Wiley & Sons), (1980). pp. 8–25.
97. Najbauer, J., Johnson, B.A., Young, A.L., and Aswad, D.W. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 10501–10509.
98. Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., and Thornton, J.M. Amino acidbase interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 2860–2874.
99. Calnan, B.J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D., and Frankel, A.D. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* 1991; 252: 1167– 1171.
100. Mitchell, J.B., Thornton, J.M., Singh, J., and Price, S.L. Towards an understanding of the arginine-aspartate interaction. *J. Mol. Biol.* 1992; 226: 251–262.
101. Bedford, M.T., Frankel, A., Yaffe, M.B., Clarke, S., Leder, P., and Richard, S. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 16030–16036.
102. Hughes, R.M., and Waters, M.L. Arginine methylation in a beta-hairpin peptide: implications for Arg- π interactions, DeltaCp(o), and the cold denatured state. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 12735–12742.
103. Sprangers, R., Groves, M.R., Sinning, I., and Sattler, M. High-resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues. *J. Mol. Biol.* 2003; 327: 507–520.
104. Pahlich, S., Zakaryan, R.P., and Gehring, H. Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1764: 1890–1903.
105. Cote, J., Boisvert, F.M., Boulanger, M.C., Bedford, M.T., and Richard, S. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol. Biol. Cell* 2003; 14: 274–287.
106. Lukong, K.E., and Richard, S. Arginine methylation signals mRNA export. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11: 914–915.
107. Smith, W.A., Schurter, B.T., Wong-Staal, F., and David, M. Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 22795–22798.
108. Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U., and Luhrmann, R. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSM4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* 2001; 7: 1531–1542.
109. Friesen, W.J., Massenot, S., Paushkin, S., Wyce, A., and Dreyfuss, G. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell* 2001a; 7: 1111–1117.

110. Cheng, D., Cote, J., Shaaban, S., and Bedford, M.T. The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol. Cell* 2007; 25: 71–83.
111. Ohkura, N., Takahashi, M., Yaguchi, H., Nagamura, Y., and Tsukada, T. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1, affects premRNA splicing in an isoform-specific manner. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 28927–28935.
112. Bachand, F., and Silver, P.A. PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *EMBO J.* 2004; 23: 2641–2650.
113. Swiercz, R., Person, M.D., and Bedford, M.T. Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian protein arginine methyltransferase 3 (PRMT3). *Biochem. J.* 2005; 386: 85–91.
114. Lee, J., and Bedford, M.T. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep.* 2002; 3: 268–273.
115. Smith, J.J., Rucknagel, K.P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H.R., and Wahle, E. Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 13229–13234.
116. Jones, S., Daley, D.T., Luscombe, N.M., Berman, H.M., and Thornton, J.M. Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 943–954.
117. Calnan, B.J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D., and Frankel, A.D. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* 1991; 252: 1167–1171.
118. Paik, W.K., and Kim, S. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967; 29: 14–20.
119. McBride, A.E., and Silver, P.A. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001; 106: 5–8.
120. Pal, S., Vishwanath, S.N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 9630–9645.
121. Jenuwein, T., and Allis, C.D. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074–1080.
122. An, W., Kim, J., and Roeder, R.G. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* 2004; 117: 735–748.
123. Rezai-Zadeh, N., Zhang, X., Namour, F., Fejer, G., Wen, Y.D., Yao, Y.L., Gyory, I., Wright, K., and Seto, E. Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1. *Genes Dev.* 2003; 17: 1019–1029.
124. Covic, M., Hassa, P.O., Sacconi, S., Buerki, C., Meier, N.I., Lombardi, C., Imhof, R., Bedford, M.T., Natoli, G., and Hottiger, M.O. Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression. *EMBO J.* 2004; 24: 85–96.
125. Yadav, N., Cheng, D., Richard, S., Morel, M., Iyer, V.R., Aldaz, C.M., and Bedford, M.T. CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPARgamma. *EMBO Rep.* 2008; 9: 193–198.

126. Zhao, X., Jankovic, V., Gural, A., Huang, G., Pardanani, A., Menendez, S., Zhang, J., Dunne, R., Xiao, A., Erdjument-Bromage, H., et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev.* 2008; 22: 640–653.
127. Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Vandell, L. Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J.* 2002; 21: 5457–5466.
128. Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, R.B. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol. Cell* 2003; 11: 1055–1066.
129. Boulanger, M.C., Liang, C., Russell, R.S., Lin, R., Bedford, M.T., Wainberg, M.A., and Richard, S. Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* 2005; 79: 124–131.
130. Xu, C., and Henry, M.F. Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 10742–10756.
131. Yu, M.C., Bachand, F., McBride, A.E., Komili, S., Casolari, J.M., and Silver, P.A. Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev.* 2004; 18: 2024–2035.
132. Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., and Sif, S. mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5- containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23: 7475–7487.
133. Ancelin, K., Lange, U.C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T., and Surani, M.A. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 623–630.
134. Hou, Z., Peng, H., Ayyanathan, K., Yan, K.P., Langer, E.M., Longmore, G.D., and Rauscher, F.J., III. The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28: 3198–3207.
135. Pal, S., Vishwanath, S.N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 9630–9645.
136. Ramon-Maiques, S., Kuo, A.J., Carney, D., Matthews, A.G., Oettinger, M.A., Gozani, O., and Yang, W. The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 18993–18998.
137. Iberg, A.N., Espejo, A., Cheng, D., Kim, D., Michaud-Levesque, J., Richard, S., and Bedford, M.T. Arginine methylation of the histone h3 tail impedes effector binding. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 3006–3010.
138. Edberg, D.D., Bruce, J.E., Siems, W.F., and Reeves, R. In vivo posttranslational modifications of the high mobility group A1a proteins in breast cancer cells of differing metastatic potential. *Biochemistry* 2004; 43: 11500–11515.
139. Jelinic, P., Stehle, J.C., and Shaw, P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol.* 2006; 4: e355. 10.1371/journal.pbio.0040355.

140. McBride, A.E., and Silver, P.A. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001; 106: 5–8.
141. Bedford, M.T., Frankel, A., Yaffe, M.B., Clarke, S., Leder, P., and Richard, S. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J. Biol. Chem.* 2000a; 275: 16030–16036.
142. Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A., and Dreyfuss G. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell* 2001a; 7: 1111–1117.
143. Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Buhler, D., Fischer, U., and Sattler, M. SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.* 2001; 8: 27–31.
144. Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J., and Revel, M. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *EMBO J.* 1997; 16: 260–266.
145. Cimato, T.R., Ettinger, M.J., Zhou, X., and Aletta, J.M. Nerve Thorngrowth factor-specific regulation of protein methylation during neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Cell Biol.* 1997; 138: 1089–1103.
146. Mowen, K.A., Schurter, B.T., Fathman, J.W., David, M., and Glimcher, L.H. Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. *Mol. Cell* 2004; 15: 559–571.
147. Meissner, T., Krause, E., Lodige, I., and Vinkemeier, U. Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* 2004; 119: 587–589.
148. Iwasaki, H., and Yada, T. Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 364: 1015–1021.
149. Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol. Cell* 2008; 31: 212–221.
150. Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol. Cell* 2008; 32: 221–231.
151. Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., and Bedford, M.T. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J. Biol. Chem.* 2005a; 280: 32890–32896.
152. Sayegh, J., Webb, K., Cheng, D., Bedford, M.T., and Clarke, S.G. Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 36444–36453.
153. Boisvert, F.M., Cote, J., Boulanger, M.C., and Richard, S. A Proteomic Analysis of Arginine-methylated Protein Complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 2003; 2: 1319–1330.
154. Boisvert, F.M., Dery, U., Masson, J.Y., and Richard, S. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev.* 2005a; 19: 671–676.
155. Boisvert, F.M., Hendzel, M.J., Masson, J.Y., and Richard, S. Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization. *Cell Cycle* 2005b; 4: 981–989.

156. Adams, M.M., Wang, B., Xia, Z., Morales, J.C., Lu, X., Donehower, L.A., Bochar, D.A., Elledge, S.J., and Carpenter, P.B. 53BP1 oligomerization is independent of its methylation by PRMT1. *Cell Cycle* 2005; 4: 1854–1861.
157. El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Hassa, P.O., Gehrig, P., Covic, M., Hubscher, U., and Hottiger, M.O. Methylation of DNA polymerase beta by protein arginine methyltransferase 1 regulates its binding to proliferating cell nuclear antigen. *FASEB J.* 2007; 21: 26–34.
158. El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Steinacher, R., Focke, F., Gehrig, P., Covic, M., Hassa, P.O., Schar, P., Hubscher, U., and Hottiger, M.O. Arginine methylation regulates DNA polymerase Beta. *Mol. Cell* 2006; 22: 51–62.
159. Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S., and Cote, J. Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 33009–33021.
160. Cheung, N., Chan, L.C., Thompson, A., Cleary, M.L., and So, C.W. Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 1208–1215.
161. Hong, H., Kao, C., Jeng, M.H., Eble, J.N., Koch, M.O., Gardner, T.A., Zhang, S., Li, L., Pan, C.X., Hu, Z., et al. Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. *Cancer* 2004; 101: 83–89.
162. Majumder, S., Liu, Y., Ford, O.H., III, Mohler, J.L., and Whang, Y.E. Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. *Prostate* 2006; 66: 1292–1301.
163. El Messaoudi, S., Fabbrizio, E., Rodriguez, C., Chuchana, P., Fauquier, L., Cheng, D., Theillet, C., Vandell, L., Bedford, M.T., and Sardet, C. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 13351–13356.
164. Feng, Q., Yi, P., Wong, J., and O'Malley, B.W. Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26: 7846–7857.
165. Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M.T., and Torchia, J. The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27: 120–134.
166. Frieze, S., Lupien, M., Silver, P.A., and Brown, M. CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1. *Cancer Res.* 2008; 68: 301–306.
167. Hou, Z., Peng, H., Ayyanathan, K., Yan, K.P., Langer, E.M., Longmore, G.D., and Rauscher, F.J., III. The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28: 3198–3207.
168. Pal, S., Vishwanath, S.N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 9630–9645.
169. Kim, J.M., Sohn, H.Y., Yoon, S.Y., Oh, J.H., Yang, J.O., Kim, J.H., Song, K.S., Rho, S.M., Yoo, H.S., Kim, Y.S., et al. Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray

- containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 473–482.
170. Pal, S., Baiocchi, R.A., Byrd, J.C., Grever, M.R., Jacob, S.T., and Sif, S. Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO J.* 2007; 26: 3558–3569.
171. Er-Chieh Cho, Shunsheng Zheng, Shonagh Munro, Geng Liu, Simon M Carr, Jutta Moehlenbrink, Yi-Chien Lu, Lindsay Stimson, Omar Khan, Rebecca Konietzny, Joanna McGouran, Amanda S Coutts, Benedikt Kessler, David J Kerr and Nicholas B La Thangue. Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1. *The EMBO Journal* 2012;31:1785-1797.
172. Jia H, Du C, Bao S, Zheng H: Protein arginine methyltransferase 1 methylates SF2/ASF at arginine. *Chinese J of Cancer Biother.* 2009; 16:216–220.
173. Sinha R, Allemand E, Zhang Z, Karni R, Myers MP, Krainer AR: Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol* 2010; 30:2762–2774.
174. Limin Zou, Han Zhang, Chaohao Du, Xiao Liu, Shanshan Zhu, Wei Zhang, Zhigang Li, Chao Gao, Xiaoxi Zhao, Mei Mei, Shilai Bao and Huyong Zheng. Correlation of SRSF1 and PRMT1 expression with clinical status of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 2012; 5:42.
175. Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardanani A, Menendez S, Zhang J, Dunne R, Xiao A, Erdjument-Bromage H, et al: Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Gene Dev* 2008; 22:640–653.
176. Choon Ping Tan and Sara Nakielnny. Control of the DNA Methylation System Component MBD2 by Protein Arginine Methylation. *Molecular and Cellular Biology* 2006;26:7224–7235.
177. Katharina Limm, Corinna Ott, Susanne Wallner, Daniel W. Mueller, Peter Oefner, Claus Hellerbrand, Anja-Katrin Bosserhoff. Deregulation of protein methylation in melanoma. *European Journal of Cancer* 2013; 49, 1305– 1313.
178. Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 15034–15044.
179. Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., and Herschman, H.R. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7723–7730.
180. Herrmann, F., Lee, J., Bedford, M. T. and Fackelmayer, F. O. Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vivo. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 38005-38010.
181. Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. Arginine Nmethyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4859–69.
182. Scorilas A, Black MH, Talieri M, Diamandis EP. Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 349–59.

183. Goulet I, Gauvin G, Boisvenue S, Cote J. Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J Biol Chem* 2007;282:33009–21
184. Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. Arginine Methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* 2000;20: 4859–69.
185. Corbo, L. Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 2010; 75: 560–564.
186. Yu Z, Chen T, Hebert J, Li E, Richard S. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 2009.
187. Gary JD, Lin WJ, Yang MC, Herschman HR, Clarke S. The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1996; 271: 12585–94.
188. Henry MF, Silver PA. A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3668–78.
189. Shen EC, Henry MF, Weiss VH, Valentini SR, Silver PA, Lee MS. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* 1998; 12: 679–91.
190. Yu MC, Lamming DW, Eskin JA, Sinclair DA, Silver PA. The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin. *Genes Dev* 2006; 20: 3249–54.
191. Wooderchak WL, Zang T, Zhou ZS, Acuna M, Tahara SM, Hevel JM. Substrate profiling of PRMT1 reveals amino acid sequences that extend beyond the “RGG” paradigm. *Biochemistry* 2008; 47: 9456–66.
192. Xie Y, Ke S, Ouyang N, He J, Xie W, Bedford MT, et al. Epigenetic regulation of transcriptional activity of pregnane X receptor by protein arginine methyltransferase 1. *J Biol Chem* 2009.
193. Robin-Lespinnasse Y, Sentis S, Kolytcheff C, Rostan MC, Corbo L, Le Romancer M. hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J Cell Sci* 2007; 120: 638–47.
194. Lim Y, Kwon YH, Won NH, Min BH, Park IS, Paik WK, et al. Multimerization of expressed protein-arginine methyltransferases during the growth and differentiation of rat liver. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723: 240–7.
195. Weiss VH, McBride AE, Soriano MA, Filman DJ, Silver PA, Hogle JM. The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 1165–71.
196. Zhang X, Cheng X. Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* 2003; 11: 509–20.
197. Miyata S, Mori Y, Tohyama M. PRMT1 and Btg2 regulates neurite outgrowth of Neuro2a cells. *Neurosci Lett* 2008; 445: 162–5.
198. Gary, J.D., and Clarke, S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1998; 61: 65–131.
199. Lee, J., and Bedford, M.T. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep.* 2002; 3: 268–273.

200. Lee, D.Y., Ianculescu, I., Purcell, D., Zhang, X., Cheng, X., and Stallcup, M.R. Surface-scanning mutational analysis of protein arginine methyltransferase 1: roles of specific amino acids in methyltransferase substrate specificity, oligomerization, and coactivator function. *Mol. Endocrinol.* 2007; 21: 1381–1393.
201. Osborne, T.C., Obiany, O., Zhang, X., Cheng, X., and Thompson, P.R. Protein arginine methyltransferase 1: positively charged residues in substrate peptides distal to the site of methylation are important for substrate binding and catalysis. *Biochemistry* 2007; 46: 13370–13381.
202. Tang J, Kao PN, Herschman HR. Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J Biol Chem* 2000; 275: 19866–76.
203. Lei NZ, Zhang XY, Chen HZ, Wang Y, Zhan YY, Zheng ZH, et al. A feedback regulatory loop between methyltransferase PRMT1 and orphan receptor TR3. *Nucleic Acids Res* 2008.
204. Higashimoto K, Kuhn P, Desai D, Cheng X, Xu W. Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 12318–23.
205. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074–80.
206. Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P. et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 2001; 293: 853–857.
207. Huang S, Litt M, Felsenfeld G. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes Dev* 2005; 19: 1885–93.
208. Kleinschmidt MA, Streubel G, Samans B, Krause M, Bauer UM. The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res* 2008.
209. Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9630–45.
210. An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* 2004; 117: 735–48.
211. Rezai-Zadeh N, Zhag X, Namour F, Fejer G, Wen YD, Yao YL, et al. Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1. *Genes Dev* 2003; 17: 1019–29.
212. Jansson M, Durant ST, Cho E-C, Sheahan S, Edelmann M, Kessler B, et al. Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1431–9.
213. Chevillard-Briet M, Trouche D, Vandel L. Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J* 2002; 21: 5457–66.
214. Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, et al. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 2001; 294: 2507–11.

215. Kwak YT, Guo J, Prajapati S, Park KJ, Surabhi RM, Miller B, et al. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell* 2003; 11: 1055–66.
216. Cheng D, Cote J, Shaaban S, Bedford MT. The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol Cell* 2007; 25: 71–83.
217. Cheung N, Chan LC, Thompson A, Cleary ML, So CW. Protein arginine methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1208–15.
218. Jobert L, Argentini M, Tora L. PRMT1-mediated methylation of TAF15 is required for its positive gene regulatory function. *Exp Cell Res* 2008.
219. Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, et al. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol Cell* 2008; 32: 221–31.
220. Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 2009; 33: 1–13.
221. McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001; 106: 5–8.
222. Huot ME, Brown CM, Lamarche-Vane N, Richard S. An adaptor role for cytoplasmic Sam68 in modulating Src activity during cell polarization. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 1933–43.
223. Cote J, Boisvert FM, Boulanger MC, Bedford MT, Richard S. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 274–87.
224. Bedford MT, Frankel A, Yaffe MB, Clarke S, Leder P, Richard S. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J Biol Chem* 2000; 275: 16030–6.
225. Chiou YY, Lin WJ, Fu SL, Lin CH. Direct mass-spectrometric identification of Arg296 and Arg299 as the methylation sites of hnRNP K protein for methyltransferase PRMT1. *Protein J* 2007; 26: 87–93.
226. Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Rucknagel KP, Schierhorn A, Moritz B, Huttelmaier S, et al. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem* 2006; 281: 11115–25.
227. Friesen WJ, Massenet S, Paushkin S, Wyce A, Dreyfuss G. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol Cell* 2001; 7: 1111–7.
228. Selenko P, Sprangers R, Stier G, Buhler D, Fischer U, Sattler M. SMN Tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2001; 8: 27–31.
229. Cote J, Richard S. Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J Biol Chem* 2005; 280: 28476–83.
230. Godin KS, Varani G. How arginine-rich domains coordinate RNA maturation events. *RNA Biol* 2007; 4: 69–75.

231. Rho J, Choi S, Jung CR, Im DS. Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity. *Arch Biochem Biophys* 2007; 466: 49–57.
232. Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Rucknagel KP, Schierhorn A, Moritz B, Huttelmaier S, et al. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-argininemethyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem* 2006; 281: 11115–25.
233. Chan JY, Hsieh TY, Liu ST, Chou WY, Chung MH, Huang SM. Physical and functional interactions between hnRNP K and PRMT family proteins. *FEBS Lett* 2009; 583: 281–6.
234. Stetler A, Winograd C, Sayegh J, Cheever A, Patton E, Zhang X, et al. Identification and characterization of the methyl arginines in the fragile X mental retardation protein Fmrp. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 87–96.
235. Boisvert FM, Chenard CA, Richard S. Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Sci STKE* 2005; 2005: re2.
236. Iwasaki H, Yada T. Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 1015–21.
237. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, et al. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008; 31: 212–21.
238. Abramovich C, Yakobson B, Chebath J, Revel M. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *EMBO J* 1997; 16: 260–6.
239. Rizzo G, Renga B, Antonelli E, Passeri D, Pellicciari R, Fiorucci S. The methyl transferase PRMT1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9- cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 551–8.
240. Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev* 2005; 19: 1466–73.
241. Weber S, Maass F, Schuemann M, Krause E, Suske G, Bauer UM. PRMT1-mediated arginine methylation of PIAS1 regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* 2009; 23: 118–32.
242. Mowen KA, Schurter BT, Fathman JW, David M, Glimcher LH. Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. *Mol Cell* 2004; 15: 559–71.
243. Barnes DE, Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 445–76.
244. Kanaar R, Wyman C, Rothstein R. Quality control of DNA break metabolism: in the 'end', it's a good thing. *EMBO J* 2008; 27: 581–8.
245. Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 402–10.
246. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999; 146: 905–16.

247. Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 2006; 21: 187–200.
248. Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, et al. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 2007; 131: 901–14.
249. Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, et al. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 2007; 318: 1637–40.
250. Lee JH, Paull TT. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 2007; 26: 7741–8.
251. Petrini JH, Stracker TH. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 458–62.
252. Kim H, Chen J. New players in the BRCA1-mediated DNA damage responsive pathway. *Mol Cells* 2008; 25: 457–61.
253. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 2007; 28: 739–45.
254. Lobrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 861–9.
255. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 301–34.
256. Βαρτκοωα Ξ, Ρεζαει Ν, Λιοντοσ Μ, Καρακαιοδοσ Π, Κλετοσασ Δ, Ισοσσεωα Ν, ετ αλ. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; 444: 633–7.
257. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; 444: 638–42.
258. Mallette FA, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* 2007; 6: 1831–6.
259. Boisvert FM, Rhie A, Richard S, Doherty AJ. The GARmotif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle* 2005; 4: 1834–41.
260. Dejardin, J. & Kingston, R. E. Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* 2009; 136: 175–186.
261. Mitchell, T. R., Glenfield, K., Jeyanthan, K. & Zhu, X. D. Arginine methylation regulates telomere length and stability. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29: 4918–4934.
262. Clare C Davies, and Axel Behrens. Arginine methylation Making its mark on AP-1 gene activation. *Cell Cycle* 2013;12:15, 1–2.
263. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004;18: 2315–35. & Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T. Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 396–402.
264. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005; 435: 1262–6.

265. Mathioudaki K, Papadokostopoulou A, Scorilas A, Xynopoulos D, Agnanti N, Talieri M. The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 2094–9.
266. Perreault A, Lemieux C, Bachand F. Regulation of the nuclear poly(A)-binding protein by arginine methylation in fission yeast. *J Biol Chem* 2007; 282: 7552–62.
267. Davies JE, Berger Z, Rubinsztein DC. Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1457–62.
268. Kwiatkowski Jr TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205–8.
269. Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009; 323: 1208–11.
270. Rappsilber J, Friesen WJ, Paushkin S, Dreyfuss G, Mann M. Detection of arginine dimethylated peptides by parallel precursor ion scanning mass spectrometry in positive ion mode. *Anal Chem* 2003; 75: 3107–14.
271. Le Romancer, M., Treilleux, I., Bouchekioua- Bouzaghrou, K., Sentis, S. Corbo, L. Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 2010; 75: 560–564.
272. Polakis, P. Drugging Wnt signalling in cancer. *EMBO J.* 2012; 31: 2737–2746.
273. Cha, B. *et al.* Methylation by protein arginine methyltransferase 1 increases stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling. *Oncogene* 2011; **30**: 2379–2389.
274. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20(Suppl. 12): S60–2.
275. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* 2006; 38: 126–36.
276. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005; 10(Suppl.1): S11–7.
277. Siroen MP, Teerlink T, Nijveldt RJ, Prins HA, Richir MC, van Leeuwen PA. The clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 203–28.
278. Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia* 2002; 45: 1609–16.
279. Sydow K, Mondon CE, Cooke JP. Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc Med* 2005; 10(Suppl.1): S35–43.
280. Jacobi J, Tsao PS. Asymmetrical dimethylarginine in renal disease: limits of variation or variation limits? A systematic review. *Am J Nephrol* 2008; 28: 224–37.
281. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572–5.
282. Wilcken DE, Sim AS, Wang J, Wang XL. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Mol Genet Metab* 2007; 91: 309–17.
283. Zakrzewicz D, Eickelberg O. From arginine methylation to ADMA: a novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BMC Pulm Med* 2009; 9: 5.

284. Chen X, Niroomand F, Liu Z, Zankl A, Katus HA, Jahn L, et al. Expression of nitric oxide related enzymes in coronary heart disease. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 346–53.
285. Mookerjee RP, Malaki M, Davies NA, Hodges SJ, Dalton RN, Turner C, et al. Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2007;45: 62–71.
286. Scott JM, Dinn JJ, Wilson P, Weir DG. Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency. *Lancet* 1981; 2(8242): 334-337.
287. Dinn JJ, Weir DG, McCann S, Reed B, Wilson P, Scott JM. Methyl group deficiency in nerve tissue: a hypothesis to explain the lesion of subacute combined degeneration. *Ir J Med Sci* 1980; 149(1): 1-4
288. Brahms H, Raymuckers J, Union A, Keysser F, Meheus L, Luhrmann R *J Biol Chem* 2000; 274: 17122-17129
289. Rho J, Choi S, Seong YR, Cho W-K, Kim SH, Im D-S. PRMT5, which forms distinct homo-oligomers, as a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 2001; 276(14): 11393-11401.
290. Chen-Yin Ou, Melissa J. LaBonte, Philipp C. Manegold, Alex Yick-Lun So, Irina Ianculescu, Daniel S. Gerke, Keith R. Yamamoto, Robert D Ladner, Michael Kahn, Jeong Hoon Kim, and Michael R. Stallcup. A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of β -catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression. *Mol Cancer Res*. 2011; 9(5): 660-670.
291. Shin DM, Chiao PJ, Sacks PG, Shin HJ, Hong WK, Hittelman WN, Tainsky MA. Activation of ribosomal protein S2 gene expression in a hamster model of chemically induced oral carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; 14: 163-166.
292. Li C, Ai AS, Lin CH, Hsieh M, Li YC, Li SY. Protein N-arginine methylation in adenosine dialdehyde-treated lymphoblastoid cells. *Arch Biochem Biophys* 1998; 351: 53-59.
293. Gu H, Park SH, Park GH, Lin IK, Lee HW, Paik WK, Kim S. Identification of highly methylated arginine residues in an endogenous 20-kDa polypeptide in cancer cells. *Life Sci* 1999; 65: 737-745.
294. Mercatante D, Kole R. Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2000; 85: 237–243.
295. Xu Q, Modrek B, Lee C. Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3754–3766.
296. Philips AV, Cooper TA. RNA processing and human disease. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 235-249.
297. Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002; 18: 123-127.
298. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B* 1972; 34: 187-220.
299. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 1958; 53: 282.
300. Neiberghs HL, Hein DW, Spratt JS. Genetic profiling of colon cancer. *J Surg Onc* 2002; 80: 204-213.
301. Nichols RC, Wang XW, Tang J, Hamilton BJ, High FA, Herschman HR, Rigby WF. The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Exp Cell Res* 2000; 256: 522-532.

302. Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 2001; 293: 853-857.
303. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer* 2002; 101: 403-408.
304. Araya N, Hiraga H, Kako K, Arao Y, Kato S, Fukamizu A. Transcriptional down-regulation through nuclear exclusion of EWS methylated by PRMT1. *Bioch Biophys Res Com* 2005; 329: 653-660.
305. Mathioudaki K, Scorilas A, Ardavanis A, Lymberi P, Tsiambas E, Devetzi M, Apostolaki A, Talieri M. Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer. *Tumor Biol.*(2011); 32:575-582.

