

**ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘ. Κ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΤΣΙΦΤΣΗΣ**  
**ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**  
**ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘ. Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΕΛΙΔΗΣ**

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ P53 ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ**  
**ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ P21<sup>WAF1/CIP1</sup> ΚΑΙ MDM2, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΗΣ BCL-2**  
**ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ**  
**ΕΝΤΕΡΟΥ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ**  
**ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΤΑ DUKES' ΚΑΙ ΤΟ**  
**ΔΕΙΚΤΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67.**

**ΚΑΛΛΙΟΠΗ Ε. ΒΑΛΑΣΙΑΔΟΥ**  
**ΙΑΤΡΟΣ - ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1999**

Στους αφανείς ήρωες

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

	2
<i>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</i> .....	
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>11</b>
<i>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</i> .....	
<b>Α΄ ΜΕΡΟΣ</b>	
1. <i>ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ</i> .....	15
2. <i>ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΛΛΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ</i> .....	16
3. <i>ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ</i> .....	18 24
4. <i>ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ</i> .....	26
5. <i>ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ</i>	29
6. <i>ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ</i>	33
7. <i>ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ</i> .....	
<b>Β΄ ΜΕΡΟΣ</b>	
1. <i>ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΕΞΕΛΛΑΓΗΣ - ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ</i> .....	37
2. <i>ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ</i> .....	51
3. <i>Η ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ</i> .....	61
4. <i>ΜΕΛΕΤΩΜΕΝΟΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ</i>	63
• <i>P53 ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ</i> .....	70
• <i>MDM2 ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ</i> .....	74
• <i>P21 ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΚΑΙ WAF-1/CIP-1 ΓΟΝΙΔΙΟ</i> .....	78
• <i>BCL-2 ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ</i> .....	81
• <i>Ki-67 ΑΝΤΙΓΟΝΟ</i> .....	
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>85</b>
1. <i>ΣΚΟΠΟΣ</i> .....	86
2. <i>ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΣ</i> .....	93
3. <i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i> .....	103
4. <i>ΠΙΝΑΚΕΣ - ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ</i> .....	

<i>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</i> .....	<i>110</i>
<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i> .....	<i>120</i>
<i>SUMMARY</i> .....	<i>122</i>
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i> .....	<i>124</i>

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### **ΕΠΙΘΕΤΟ**

Βαλασιάδου

### **ΟΝΟΜΑ**

Καλλιόπη

του Ευαγγέλου και της Χαριτωμένης

### **ΗΜ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ**

26 Ιουνίου 1967

### **ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ**

Ξάνθη

### **ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΟΙΚΙΑΣ**

Ηράκλειο Κρήτης

☎081-841288

☎094-566044

E-mail: [wallace@danae.med.uoc.gr](mailto:wallace@danae.med.uoc.gr)

### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

☞ **1979-1985**

Γυμνάσιο – Λύκειο Ξάνθης

☞ **1985 - 1991**

Ιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου

Θεσσαλονίκης (μετά από εισαγωγικές

εξετάσεις)

### **ΠΤΥΧΙΑ - ΤΙΤΛΟΙ**

☞ **Δεκ/1983**

Πτυχίο Αγγλικής Lower με βαθμό “Α”

☞ **Φεβρουάριος 1987**

Πτυχίο πιάνου από το Εθνικό Ωδείο Αθηνών με βαθμό «Άριστα Παμψηφεί»

☞ **6/11/1991**

Πτυχίο Ιατρικής από το Αριστοτέλειο

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης με γενικό βαθμό

7,4 (λίαν καλώς)

☞ **22/11/1991**

Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος

☞ **21/4/1999**

Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Χειρουργικής

☞ **15/5/1999**

Επιτυχείς εξετάσεις στο “Advanced Trauma Life Support” Course του American College of Surgeons

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά

**ΘΕΣΕΙΣ ΜΕΤΑ ΤΟ  
ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

☞ 1/2/1992 ως 30/4/1992

Εφημερεύουσα Ιατρός στη Γενική Κλινική  
Θεσσαλονίκης

☞ 8/7/1992 - 11/7/1995

Ειδικευόμενη Χειρουργικής στην Κλινική της  
Χειρουργικής Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού  
Νοσοκομείου Ηρακλείου

☞ 4/9/1995-4/2/1997

Αγροτική Ιατρός στο Περιφερειακό Ιατρείο  
Αγ.Μύρωνα, επαρχία Μαλεβιζίου, Ν. Ηρακλείου  
Κρήτης (υπηρεσία υπαίθρου)

☞ 17/2/1997- 20/2/1999

Συνέχιση και ολοκλήρωση της ειδικότητας της  
Χειρουργικής στην Κλινική της Χειρουργικής  
Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου  
Ηρακλείου

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

**ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ**

**1. Η ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Η. Σανιδάς, **Κ. Βαλασιάδου**. Ελληνική Χειρουργική, 1997; 69: 502-512.

**2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΑΜΒΛΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΙΤΡΑΙΝΟΥΣΕΣ ΚΟΙΛΙΑΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ**

Η. Σανιδάς, **Κ. Βαλασιάδου**. Ελληνική Χειρουργική, 1998; 70: 407-418.

**3. ΔΙΗΘΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΟΔΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΟΙΣΟΦΑΓΟΥ**

Ι. Μελισσάς, Μ.Ε. Σπυριδάκης, **Κ. Βαλασιάδου**, Ι. Ρωμανός, Μ. Χριστοδουλάκης.  
Ελληνική Χειρουργική, in press.

**ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ**

**1. NEUROFIBROSARCOMA OF THE DUODENUM.**

*J. Melissas, G. Schoretsanitis, **K. Valasiadou**, N. Vrahasotakis, D.D. Tsiftsis.*

European Journal of Surgical Oncology, 1995; 21: 571-572.

**2. BOOP PRESENTING WITH HAEMOPTYSIS AND MULTIPLE CAVITARY NODULES.**

*M. Froudarakis, D. Bouros, R. Loire, **K. Valasiadou**, D. Tsiftsis, N.M. Siafakas.*

European Respiratory Journal, 1995; 8: 1972-1974 (editorial).

### **3. IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF P53, BCL-2, MDM2 AND WAF1/P21 PROTEINS IN COLORECTAL ADENOCARCINOMAS.**

*K.E. Valassiadou, K. Stefanaki, M. Tzardi, G. Datsaris, V. Georgoulas, J. Melissas, D.D. Tsiftsis, G. Delides, P. Kanavaros.*

Anticancer Research, 1997; 17: 2571-2576.

### **4. IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF MIB1 (KI-67) PROTEIN IN COLORECTAL ADENOCARCINOMAS.**

*K. Valassiadou, K. Stefanaki, I. Vlahonikolis, E. Sanidas, D.D. Tsiftsis, I. Melissas, V. Georgoulas, S. Kakolyris, G. Delides, P. Kanavaros.*

Electronic Journal of Pathology and Histology, 1997;3.2: 972-03.txt

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ ΣΕ ΣΥΓΓΡΑΜΜΑΤΑ**

### **1. Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ**

*H. Σανιδάς, B. Γάκη, K. Βαλασιάδου*

Θέματα Γενικής Χειρουργικής από τα Σεμινάρια 1997 της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρίας. Τόμος Α', κεφ. III, σελ. 214-237, εκδόσεις επιτροπής εκπαίδευσης Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρίας, Αθήνα 1997.

### **2. ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟ ΑΡΧΕΙΟ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ: ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΣΟ.**

*H. Σανιδάς, K. Βαλασιάδου, A. Καφετζάκης, A. Γιαννόπουλος, X. Μαρκογιαννάκης, Σ. Βλαζάκης, I. Μελισσάς, A. Τσιφτσής.*

Εξελίξεις στη Χειρουργική 1998, τόμος 1, κεφ 13, σελ. 218-220, Εκδόσεις Σύνεδρον 1998.

### **3. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΡΡΑΠΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΩΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΕΠΗΡΕΑΣΕΙ ΣΟΒΑΡΑ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΩΝ.**

*H. Σανιδάς, X. Αντωνίου, K. Βαλασιάδου, A. Καφετζάκης, I. Μελισσάς, A. Τσιφτσής.*

Εξελίξεις στη Χειρουργική 1998, τόμος 1, κεφ 12, σελ. 209-210, Εκδόσεις Σύνεδρον 1998.

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

### **1. MORTALITY FOLLOWING INDUCED PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA AND IMMUNOLOGICAL CHANGES AFTER SPLENECTOMY, SPLENIC AUTOTRANSPLANTATION AND LIGATION OF THE SPLENIC ARTERY IN RABBITS.**

*J. Melissas, A.A. Wadee, A. Yannopoulos, K. Valasiadou, D. Lewis.*

7<sup>th</sup> Meeting of the Association of Academic Departments of Surgery in Europe (ADSE) Amsterdam, The Netherlands, 12 - 13 March 1993

J R Coll Surg Edinb, August 1993; 38: 255

**2. ΒΡΟΓΧΟΣΚΟΠΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΟΙΣΟΦΑΓΟΥ  
(αναρτημένη ανακοίνωση)**

*I. Μελισσάς, Μ. Σπυριδάκης, Κ. Βαλασιάδου, Α. Γιαννόπουλος, Ε. Γοντικάκης, Δ. Τσιφτσής.*  
13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Ρόδος, 13 - 17 Οκτωβρίου 1993  
Ελληνική Γαστρεντερολογία, 1993; 6 ( συμπλ. τεύχος): σελ. 25

**3. IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF p53 PROTEIN IN RELATION TO  
p21<sup>waf1/cip1</sup>, mdm2, bcl-2 PROTEIN EXPRESSION AND PROLIFERATION ANTIGEN Ki-  
67/MIB1 IN HUMAN COLORECTAL ADENOMAS AND ADENOCARCINOMAS**

*K. Valassiadou, K. Stefanaki, Sanidas E, P. Kanavaros, J. Melissas, D. Tsiftsis, G.  
Delides.*

11<sup>th</sup> Meeting of the Association of Academic Departments of Surgery in Europe  
(ADSE), Tuebingen, Germany 18/19 April 1997  
J R Coll Surg Edinb (In press)

**4. INDUCTION CHEMOTHERAPY IN WOMEN WITH BREAST CANCER STAGE II, III  
AND IV: LESSONS TO BE LEARNED**

*V. Gaki, E. Sanidas, S. Kakoliris, H. Kourousis, E. Gontikakis, K. Valasiadou, G.  
Halkiadakis and D.D. Tsiftsis.* 7<sup>th</sup> European Congress of Surgery, Athens 3-7 June 1997  
Br J Surg 1997;84(Suppl 2):16

**5. OBESITY ASSOCIATED DISORDERS IN MORBIDLY AND SUPEROBESE PATIENTS.  
COMPARISON FOLLOWING SURGICAL WEIGHT-REDUCTION**

J. Melissas, G. Schoretsanitis, M. Christodoulakis, K. Valasiadou, H. Sanidas and D.D.  
Tsiftsis  
3<sup>rd</sup> World Congress of the International Federation for the Surgery of Obesity, Bruges, Belgium, 3-  
5 Sep 1998, Obesity Surgery 1998; 8(4):375

**6. IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF p-53, p21, bcl-2, bax, Rb AND Ki-67  
(MIB-1) PROTEINS IN COLORECTAL ADENOCARCINOMAS.**

*K. Stefanaki, J. Vlachonikolis, K. Valassiadou, M. Tzardi, V. Chaniotis, D. Tsiftsis, D. Delides, P.  
Kanavaros.*  
13<sup>th</sup> World Congress of Academic and Environmental Pathology, Nice, France, 18-23 October  
1998, Archives D' Anatomie et de Cytologie Pathologiques 1998;46(5-6):413

**ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

**ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

**1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΤΟΥ ΑΚΡΩΤΗΡΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΑΤΩ ΑΚΡΩΝ ΣΕ  
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΑΡΘΗΡΟΠΑΘΕΙΑ**

*K. Βαλασιάδου, Γ. Τζοβάρας, Σ. Καρακαντά, Ι. Δροσίτης, Α. Κατσαμούρης*  
6<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 12 - 15 Νοεμβρίου 1992



- 2. ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΘΡΟΜΒΟΕΜΒΟΛΗ: Η ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΜΕΝΗΣ ΕΜΒΟΛΕΚΤΟΜΗΣ**  
*I. Δροσίτης, I. Άρμπιρος, Κ. Βαλασιάδου, Κ. Χρήστου, Α. Κατσαμούρης.*  
 6<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 12 - 15 Νοεμβρίου 1992
- 3. Η ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΑΜΕΣΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ**  
*Κ. Βαλασιάδου, Ε. Γοντικάκης, I. Μελισσάς, Δ. Τσιφτσής.*  
 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Θεσσαλονίκη 30 Οκτωβρίου-3 Νοεμβρίου 1994
- 4. ΘΝΗΤΟΤΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΤΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ ΣΕ ΣΠΛΗΝΕΚΤΟΜΗΘΕΝΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΛΙΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΠΛΗΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΣ Η ΑΥΤΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΣΠΛΗΝΟΣ**  
*I. Μελισσάς, Μ. Σπυριδάκης, Μ. Χριστοδουλάκης, Κ. Βαλασιάδου, Α.Α. Wadee.*  
 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Θεσσαλονίκη 30 Οκτωβρίου-3 Νοεμβρίου 1994  
 ( η ανακοίνωση πήρε βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης από την οργανωτική επιτροπή του συνεδρίου )
- 5. Η ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ**  
*Καλ . Βαλασιάδου, Η. Σανιδάς, Βασ. Γάκη, Ν. Ρεθυμνιωτάκης, Δ. Τσιφτσής*  
 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μαστολογίας, Πάτρα 23-25 Ιουνίου 1995
- 6. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ p53, p21/waf-1, bcl-2, bax, rb ΚΑΙ Ki-67 ΣΕ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΔΕΝΩΜΑΤΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**  
*Κ. Στεφανάκη, Κ. Βαλασιάδου, Μ. Τζαρδή, Β. Χανιώτης, Σ. Μπολιώτη, Κ. Δαριβιανάκη, Ε. Καρόδη, Δ. Τσιφτσής, Γ. Δελίδης, Π. Καναβάρος.*  
 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αλεξανδρούπολη 21-24 Μαΐου 1998
- 7. Η ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΑ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΚΑΛΟΗΘΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΟΥ ΧΟΛΗΦΟΡΟΥ ΔΕΝΔΡΟΥ**  
*Α. Χατζηδάκης, Π. Κόρακας, Ε. Σφακιωτάκης, Γ. Τσιαούσης, Κ. Βαλασιάδου, Γ. Ρωμανός, Γ. Χαλκιαδάκης, Ν. Γκουρτσογιάννης.*  
 11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 23-27 Σεπτεμβρίου 1998
- 8. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΠΛΩΝ ΘΩΡΑΚΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ: ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΕΙ Ο ΓΕΝΙΚΟΣ ΙΑΤΡΟΣ**  
*Η. Σανιδάς, Α. Καφετζάκης, Κ. Βαλασιάδου, Θ. Μόσχοβος, Σ. Καρνιαδάκης, Γ. Χαλκιαδάκης, Δ.Δ. Τσιφτσής.*  
 9<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο 5-8 Νοεμβρίου 1998
- 9. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΠΛΩΝ ΘΩΡΑΚΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΤΕΠ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ: ΑΝΑΓΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΠΕΡΙΘΑΛΨΗΣ**  
*Η. Σανιδάς, Α. Καφετζάκης, Κ. Βαλασιάδου, Θ. Μόσχοβος, Γ. Αλαμάνος, Γ. Χαλκιαδάκης, Δ.Δ. Τσιφτσής.*

9<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο 5-8 Νοεμβρίου 1998

**10. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΔΕΛΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ**

*H. Σανιδάς, A. Σαλούστρος, K. Βαλασιάδου, A. Καφετζάκης, X. Μαργογιαννάκης, Δ.Δ. Τσιφτσής.*

9<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο 5-8 Νοεμβρίου 1998

**11. ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟ ΑΡΧΕΙΟ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ: ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΣΟ.**

*H. Σανιδάς, K. Βαλασιάδου, A. Καφετζάκης, A. Γιαννόπουλος, X. Μαργογιαννάκης, Σ. Βλαζάκης, I. Μελισσάς, Δ. Τσιφτσής.*

21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα, 13-17 Νοεμβρίου 1998

**12. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΡΡΑΠΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΩΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΕΠΗΡΕΑΣΕΙ ΣΟΒΑΡΑ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΩΝ.**

*H. Σανιδάς, X. Αντωνίου, K. Βαλασιάδου, A. Καφετζάκης, I. Μελισσάς, Δ. Τσιφτσής.*

21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα, 13-17 Νοεμβρίου 1998

**ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

**1. USE OF STAPLING INSTRUMENTS IN A UNIVERSITY HOSPITAL. HAVE YOU SEEN A HAND SEWN ANASTOMOSIS?**

*C. Antoniou, E. Sanidas, K. Valassiadou, A. Kafetzakis, S.J. Vassilakis, D.D. Tsiftsis.*

2<sup>nd</sup> Mediterranean Congress of Thoracic Diseases, Athens, Greece, 4-7 March 1998

**2. "TRAUMATIC" EXPERIENCE FROM THE ORGANIZATION OF A HOSPITAL TRAUMA REGISTRY IN A GREEK UNIVERSITY HOSPITAL**

*E. Sanidas, K. Valassiadou, A. Kafetzakis, H. Markogiannakis, A. Giannopoulos, S. Vlasakis, S. Karniadakis, G. Alamanos, J. Melissas, D.D. Tsiftsis.*

European Symposium on Trauma, Linkoping, Sweden, August 30-September 2, 1998

**ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (POSTERS)**

**1. ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ, ΕΠΕΜΒΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΙΙΙ ΚΑΙ ΙV**

*H. Σανιδάς, K. Βαλασιάδου, E. Γοντικάκης, Σ. Κακολύρης, X. Κουρούσης, Γ. Χαλκιαδάκης*

5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μαστολογίας, Πάτρα 23 - 35 Ιουνίου 1995

Αναρτημένη Ανακοίνωση Νο 16

**2. ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΜΗ ΗΟDΓΚΙΝ Β-ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΙΑΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ**

*K. Στεφανάκη, Σ. Μπολιώτη, Β. Γάκη, K. Βαλασιάδου, Δ. Τσιφτσής, Π. Καναβάρος.*

6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αλεξανδρούπολη, 21-24 Μαΐου 1998

**3. Η ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΔΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΒΕΛΟΝΗΣ (FNA) ΣΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΜΟΝΗΡΩΝ ΨΗΛΑΦΗΤΩΝ ΜΟΡΦΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ**

*H. Σανιδάς, Κ. Βαλασιάδου, Γ. Σχορετσανίτης, C.F.Russel, Δ.Δ. Τσιφτσής*

9<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο 5-8 Νοεμβρίου 1998

Αναρτημένη Ανακοίνωση Νο 35

**4. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΕ Η/Υ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟΥ ΑΡΧΕΙΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ**

*H. Σανιδάς, Α. Σαλούστρου, Α. Καφετζάκης, Κ. Βαλασιάδου, Χ. Μαρκογιαννάκης, Α. Γιαννόπουλος, Δ.Δ. Τσιφτσής*

21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα 13-17 Νοεμβρίου 1998

Αναρτημένη Ανακοίνωση Νο 274

## 20. ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (Citations)

---

---

Το άρθρο **IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF P53, BCL-2, MDM2 AND WAF1/P21 PROTEINS IN COLORECTAL ADENOCARCINOMAS.**

*K.E. Valassiadou, K. Stefanaki, M. Tzardi, G. Datseris, V. Georgoulas, J. Melissas, D.D.Tsiftsis, G. Delides, P. Kanavaros.*

Anticancer Research, 1997; 17: 2571-2576.

---

---

**1. Current advances in cancer research. 1997 Nov Vol.10, No 11, pg822.**

---

---

Το άρθρο **BOOP PRESENTING WITH HAEMOPTYSIS AND MULTIPLE CAVITARY NODULES.**

*M. Froudarakis, D. Bouros, R. Loire, K.Valasiadou, D.Tsiftsis,N.M. Siafakas.*

European Respiratory Journal, 1995; 8: 1972-1974.

---

---

1. Cordier JF. Cavitory bronchiolitis organizing pneumonia. Eur Respir J 1995;8:1822-1823.
2. Αναφορά στη βιβλιογραφία επιλογής άρθρων του 1997, στο Clinical Year in Reviews, Bibliographies 1997, International Conference of the American Lung Association and the American Thoracic Society 1997. Ch: Interrstitial Lung Disease-The Many Phases of Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia (BOOP), page 26.

## ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

1. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ 1<sup>ΟΥ</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Χειρουργικής της Παχυσαρκίας (Τοπική Οργανωτική Επιτροπή).

Ηράκλειο, 8-9 Μαΐου 1998-06-03

Οργάνωση: Ελληνική Χειρουργική Εταιρία Παχυσαρκίας

2. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ Επιστημονικής Ημερίδος με Θέμα: «Κλειστές και Ανοικτές  
Θωρακικές Κακώσεις»

Ηράκλειο, 3 Απριλίου 1999

Οργάνωση: Ελληνική Εταιρία Τραύματος

## ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ ΣΕ ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ

### ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

1. **Οργάνωση:** Σύλλογος Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος  
**Τόπος:** Θεσσαλονίκη 1990  
**Θέμα:** 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής  
**Εισήγηση:** Προπτυχιακή Ιατρική Εκπαίδευση
2. **Οργάνωση:** Παράρτημα Ελληνικού Ινστιτούτου Πληροφορικής (ΕΙΠ)  
**Τόπος:** Ηράκλειο, 23 Μαΐου 1998  
**Θέμα:** Ημερίδα Ιατρικής Πληροφορικής INFOMED 98  
**Εισήγηση:** Βάση Δεδομένων Περιστατικών Μείζονος Τραύματος

## 7. ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

1. Διδασκαλία του μαθήματος "Χειρουργικές Λοιμώξεις" σε φοιτητές του τέταρτου έτους ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης (Υπεύθυνος Μαθήματος Καθ. κ. Δ.Δ.Τσιφτσής) για το Ακαδημαϊκό έτος 1992-1993.
2. Συμμετοχή στη εκπαίδευση των φοιτητών στο μάθημα της Άσκησης της Κλινικής Χειρουργικής την περίοδο 1992-1995 και 1997-1998. Συντονιστής κ. Α. Κατσαμούρης.
3. Συμμετοχή ως διδάσκων στο κατ'επιλογήν μάθημα 6<sup>ο</sup> εξαμήνου 'Εφαρμογές των Η/Υ στην Κλινική Ιατρική' (υπεύθυνος μαθήματος Καθ. κ. Δ. Τσιφτσής) του ακαδημαϊκού έτους 1992-1993.
4. Διδάσκων στο πρόγραμμα λήψης ειδικοτήτων του νοσηλευτικού προσωπικού στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου 1993-1994
5. Συμμετοχή στην εκπαίδευση των φοιτητών στην Προπαιδευτική Χειρουργική το ακαδημαϊκό έτος 1997 (υπεύθυνος μαθήματος Αν.Καθ. κ. Ι. Μελισσάς).

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- 1.** Επί 2 έτη (1990 και 1992) βοήθησα στη συλλογή στοιχείων για το Πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για τη Λήψη Αντικειμενικών Αποφάσεων στον Ίκτερο (Euricterus Project) στην Ομάδα Διεύθυνσης του οποίου (Project Management Team) είναι ο καθηγητής κ. Δ. Τσιφτσής.
- 2.** Επί 2 έτη (1993 - 1995) υπεύθυνη της Ελληνικής ομάδας συλλογής στοιχείων και παρακολούθησης των ασθενών στο πρωτόκολλο C/4/87 (International Adjuvant Trial in Postmenopausal Breast Cancer, 4-Epidoxorubicin+Tamoxifen vs Tamoxifen only) του International Collaborative Cancer Group για τον καρκίνο του μαστού.
- 3.** Υπεύθυνη της Ελληνικής ομάδας συλλογής στοιχείων και παρακολούθησης των ασθενών στο πρωτόκολλο C/12/95 (Feasibility Study of Chemohormonal Therapy with Intensified Epirubicin in Postmenopausal Women with Node Positive Early Breast Cancer) του International Collaborative Cancer Group για το έτος 1996.
- 4.** Σε εξέλιξη βρίσκεται η δημιουργία προγράμματος βάσης δεδομένων στο οποίο θα εισάγονται τα στοιχεία των ασθενών με τραυματικές κακώσεις με σκοπό τη δημιουργία βάσης δεδομένων. Το πρόγραμμα θα έχει τη δυνατότητα αυτόματου υπολογισμού των διαφόρων κλιμάκων βαρύτητας των κακώσεων (AIS90, ISS90, RTS, TRISS, ICISS, TS). Ελπίζεται η δημιουργία κοινής Ελληνικής Βάσης Δεδομένων Μείζονος Τραύματος κατά τα πρότυπα της British Major Trauma Outcome Study με τους υπευθύνους της οποίας είμαστε σε επαφή για μελλοντική συνεργασία. Το πρόγραμμα έχει χρηματοδοτηθεί από το Κ.Ε.Σ.Υ.



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**Ο** καρκίνος είναι μία νόσος και πολλές νόσοι μαζί. Η κοινή όψη της νόσου χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη· αποδιοργανωμένοι ιστοί που επεκτείνονται χωρίς όριο, εμποδίζοντας τη φυσιολογική λειτουργία των οργάνων και απειλώντας τη ζωή του ξενιστή. Τα πολλά πρόσωπα προέρχονται από την εμφάνιση σε διάφορες περιοχές του σώματος. Κάθε τύπος κυττάρου, κάθε ιστός, μπορεί να γεννά ξεχωριστό τύπο όγκου με αυτοδύναμο ρυθμό αύξησης, πρόγνωση και επιδεκτικότητα στη θεραπεία. Η ανάπτυξη των κακοήθων νεοπλασμάτων είναι μια σύνθετη και πολυσταδιακή διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα αποκτούν τον πλήρη νεοπλασματικό φαινότυπο μέσα από μία σειρά προοδευτικών αλλοιώσεων. Οι αλλοιώσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων κλώνων κυττάρων. Κάθε νέος κλώνος έχει πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των προηγούμενων αλλά φέρει όλο και περισσότερες γενετικές αλλοιώσεις. Έτσι, μέσα από διαδοχικά αναπτυσσόμενους κλώνους οδηγούμαστε στη νεοπλασματική εκτροπή και την κακοήθη εξαλλαγή. Η θεωρία αυτή υποστηρίζεται από επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο αλλά και από *in vitro* και *in vivo* μελέτες εξαλλαγής των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα με τη χρήση ιών, ακτινοβολίας ή χημικών ουσιών, αλλά και με βιοχημικές και παθολογοανατομικές αναλύσεις των όγκων του ανθρώπου<sup>1</sup>.

Η αυξανόμενη γνώση των γενετικών αλλοιώσεων στα διάφορα νεοπλάσματα και η απλοποίηση των τεχνικών της μοριακής βιολογίας συνέβαλαν στην αναζήτηση μεταλλάξεων ως δεικτών της νεοπλασματικής εκτροπής. Η ανάλυση της ογκογένεσης σε ένα όργανο απαιτεί α) την αναγνώριση των γενετικών αλλοιώσεων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του κακοήθους νεοπλάσματος και β) την αναγνώριση του ρόλου τους στη νεοπλασματική εξαλλαγή.

Το καρκίνωμα του παχέος εντέρου αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου στο δυτικό κόσμο μετά τα καρκινώματα του πνεύμονα και του μαστού. Η ανάπτυξη των περισσότερων νεοπλασματικών όγκων του παχέος εντέρου επισυμβαίνει μέσα από μία σειρά συγκεκριμένων αλλοιώσεων. Από το φυσιολογικό βλεννογόνο αναπτύσσονται καλοήθεις όγκοι, τα αδενώματα και ένα 20% από αυτά μεταπίπτει σε κακοήγη όγκο, το αδενοκαρκίνωμα<sup>2</sup>. Έτσι, είναι δυνατό να μελετηθούν οι όγκοι αυτοί στα διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους και γι' αυτό το λόγο αποτελούν ιδανικό σύστημα μελέτης των γενετικών αλλοιώσεων που επισυμβαίνουν κατά τη νεοπλασματική εκτροπή.

Από τα στοιχεία διεθνών επιδημιολογικών μελετών σε πληθυσμούς που μεταναστεύουν υπάρχει η ένδειξη ότι κύριο ρόλο στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου παίζουν περιβαλλοντικοί-διαιτητικοί παράγοντες. Παρ' όλα αυτά, μεταξύ πληθυσμών υψηλού κινδύνου υπάρχουν οικογενειακοί-γενετικοί παράγοντες που προκαλούν διαφορετική επιδεκτικότητα στον περιβαλλοντικό κίνδυνο. Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου αποτελούν ετερογενή ομάδα από γενετική άποψη, εφόσον είναι δυνατό να αναπτυχθούν μέσω διαφορετικών γενετικών οδών. Οι μεταλλάξεις που ενέχονται στις οδούς της νεοπλασματικής εκτροπής μπορεί να είναι διαφορετικές, χωρίς όμως να αποκλείεται η αλληλοεπικάλυψή τους.

Παρ' όλα αυτά, σε λίγους άλλους όγκους είμαστε τόσο κοντά στο να αναγνωρίσουμε τα κρίσιμα συμβάματα που οδηγούν στην κακοήγη νεοπλασματική συμπεριφορά, όσο στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου<sup>3</sup>.

Στην προσπάθεια τους να κατανοήσουν τους μηχανισμούς που ενέχονται στη γενετική οδό των νεοπλασιών, οι ερευνητές μελετούν τους κυτταρικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται ή καταστέλλονται στα νεοπλασματικά κύτταρα. Αυτά που μπορούμε να διδαχθούμε από την ανάλυση των αλλοιώσεων ενός συγκεκριμένου γονιδίου εξαρτώνται άμεσα από το βιολογικό περιβάλλον στο οποίο εμφανίζονται.

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημική μέθοδο η έκφραση των p53, mdm2, p21 waf1, bcl-2, πρωτεϊνών σε αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου με σκοπό να αποκτήσουμε έμμεση πληροφόρηση για τους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην ογκογένεση αυτών των νεοπλασμάτων και να συσχετίσουμε την έκφραση τους με την ιστολογική διαφοροποίηση, το στάδιο κατά Dukes' του όγκου και το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1, ώστε να



εκτιμήσουμε την κλινική τους αξία όσον αφορά στην πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των όγκων αυτών.

Θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στους κ.κ. Δημήτριο Τσιφτσή, Καθηγητή Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, Γεώργιο Δελίδη, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και Ιωάννη Μελισσά, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την ανάθεση και την επίβλεψη της εργασίας αυτής, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιστολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πρώην Επίκουρου Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κ.Παναγιώτη Καναβάρο και στην Επιμελήτρια Β' Παθολογικής Ανατομικής του Νοσοκομείου Παιδών Αθηνών κ.Καλλιόπη Στεφανάκη εκφράζω θερμές ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη για την πολύτιμη συμβολή τους στο εργαστηριακό και συγγραφικό μέρος της μελέτης αυτής.

Τέλος, ευχαριστώ το Λέκτορα Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ.Ηλία Σανιδά, για τη βοήθειά του στην απόδοση των σχημάτων και τη μορφοποίηση του κειμένου, καθώς και τη βιολόγο κ.Κατερίνα Δαριβιανάκη και την κ.Έλλη Καρύδη, μέλος ΕΔΤΠ του Τομέα Μορφολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη βοήθειά τους στην εφαρμογή των τεχνικών ανοσοϊστοχημείας.

## ***A' ΜΕΡΟΣ***

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

**T**ο καρκίνωμα του παχέος εντέρου αποτελεί τον τρίτο σε συχνότητα καρκίνο για άντρες και γυναίκες και τη δεύτερη κατά σειρά αιτία θανάτου από καρκίνο στο Δυτικό κόσμο. Το 1993 υπολογίστηκαν 152.000 νέα περιστατικά και 57.000 θάνατοι από τη νόσο στις ΗΠΑ<sup>4</sup>. Η επίπτωση του καρκινώματος του παχέος εντέρου ποικίλλει ανά τον κόσμο. Είναι πιο συχνή στη Βόρειο Αμερική και Βόρειο Ευρώπη, λιγότερο συχνή στη Νότιο Αμερική και σπανιότερη στην Αφρική και την Ασία<sup>5</sup>. Η διαφορά αυτή δε φαίνεται να σχετίζεται με γενετικούς, αλλά με περιβαλλοντικούς και διαιτητικούς παράγοντες διότι σε πληθυσμούς που μεταναστεύουν από περιοχές χαμηλής σε περιοχές υψηλής επίπτωσης παρουσιάζεται αύξηση της συχνότητας της νόσου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η διαφορά στην επίπτωση μεταξύ Ιαπώνων της Χαβάης και Ιαπώνων της Ιαπωνίας, καθώς και μεταξύ μαύρων της Αφρικής και μαύρων της Αμερικής<sup>6,7</sup>.

Στο Δυτικό κόσμο, η εμφάνιση του καρκινώματος του παχέος εντέρου και του ορθού αυξάνει μετά την ηλικία των 50 ετών και συνεχίζει να αυξάνει για κάθε νέα δεκαετία ζωής, με μέση ηλικία έναρξης της νόσου τα 63 έτη (ΗΠΑ), ενώ στις υποανάπτυκτες χώρες με χαμηλή επίπτωση η μέση ηλικία έναρξης είναι 15 έτη νωρίτερα, με υπεροχή των πρωτοπαθών εστιών στο δεξιό κόλον<sup>8</sup>. Παρά το γεγονός ότι η επίπτωση της νόσου αυξάνεται, έχει παρατηρηθεί μικρή μείωση του ποσοστού θνητότητας που πιθανόν οφείλεται στη διάγνωση της νόσου σε προϋμότερο στάδιο με τη χρήση της κολονοσκόπησης και την αφαίρεση προκαρκινωματώδων βλαβών με ενδοσκοπική πολυπεκτομή, μέθοδοι που εφαρμόζονται ευρέως τις τελευταίες δεκαετίες<sup>9</sup>.

## ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΛΛΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ

Ένας από τους πιο σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που ενέχονται στην εμφάνιση του καρκινώματος του παχέος εντέρου είναι το είδος της διατροφής. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού ζωικού λίπους και κρέατος στο σύνολο των ημερήσιων λαμβανομένων θερμίδων και της επίπτωσης της νόσου. Η διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε ίνες φαίνεται επίσης να αυξάνει την επίπτωση, όχι όμως ανεξάρτητα από τη λήψη αυξημένης ποσότητας κρέατος<sup>10,11</sup>.

Ο μηχανισμός με τον οποίο αυξάνεται η επίπτωση της νόσου φαίνεται να σχετίζεται με το ρόλο των χολικών οξέων στον πολλαπλασιασμό του επιθηλίου του παχέος εντέρου. Παράλληλα με την αύξηση του προσλαμβανόμενου ζωικού λίπους αυξάνεται και το ποσοστό των χολικών και λιπαρών οξέων που απεκκρίνεται στα κόπρανα. Σε πειραματικά ζωικά μοντέλα έχει αποδειχτεί ότι το δεοξυχολικό οξύ οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου που δρουν ως ανεξάρτητος παράγοντας στην αύξηση του πολλαπλασιασμού του εντερικού επιθηλίου. Το ίδιο συμβαίνει και κατά την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων<sup>12</sup>. Αντίθετα, η πρόσληψη ελαιόλαδου και λίπους ιχθύων, τα οποία είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως σε ω-3 λιπαρά οξέα, φαίνεται να έχει προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης της νόσου. Γεωγραφικές περιοχές στις οποίες η διατροφή των κατοίκων αποτελείται κυρίως από ψάρια τείνουν να έχουν χαμηλή επίπτωση καρκινώματος παχέος εντέρου. Όσον αφορά στην πρόσληψη τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες, φαίνεται ότι δρα προστατευτικά στο εντερικό επιθήλιο<sup>13,14,15</sup>. Αυτό αποδίδεται: α) στην ταχύτερη διέλευση των κοπράνων και τη διάλυση των υπολοίπων συστατικών που οδηγούν σε μικρότερο χρόνο επαφής των πιθανών βλαβερών ουσιών με το επιθήλιο του παχέος εντέρου, β) στη δέσμευση τοξικών ουσιών από τα πολυμερή των ινών και γ) στη μείωση του εντερικού pH και την παραγωγή λιπαρών οξέων μικρής αλύσου που πιθανόν να προστατεύουν το επιθήλιο από την επίδραση των χολικών οξέων<sup>13,14</sup>.

Παράλληλα, ο κατάλογος των μικροστοιχείων των τροφών με αντικαρκινικές ιδιότητες σε πειραματικά ζωικά μοντέλα αυξάνεται συνεχώς. Οργανοθειικά

συστατικά που περιέχονται στα φυτά του γένους *Allium* (που περιλαμβάνει τα γνωστά μας είδη κρεμμύδι και σκόρδο), το ισοθειοκυανικό βενζύλιο που περιέχεται στα λαχανικά και τα μονοτερπένια που περιέχονται στα εσπεριδοειδή, προλαμβάνουν την ενεργοποίηση προκαρκινογόνων ουσιών<sup>16</sup>. Βιταμίνες που αποτελούν ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες όπως οι Α, C και Ε πιθανόν να έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες αλλά από προοπτικές μελέτες δεν αποδείχθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων συγκέντρωσης στον ορό του αίματος και της πιθανότητας εμφάνισης γαστρεντερικού καρκίνου<sup>14</sup>.

Έχει εκτιμηθεί επιδημιολογικά ότι οι χρήστες ασπιρίνης παρουσιάζουν σε μικρότερο ποσοστό καρκινώματα του πεπτικού σωλήνα. Σε ζωικά μοντέλα καρκινώματος παχέος εντέρου η ασπιρίνη και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη αναστέλλουν την ανάπτυξη των όγκων. Σημαντική μείωση (περίπου 40%) των θανάτων από καρκινώματα οισοφάγου, στομάχου και παχέος εντέρου έχει παρατηρηθεί στους χρήστες ασπιρίνης<sup>17</sup> και η χορήγηση σουλινδάκης για 9 μήνες σε άτομα με Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους και του αριθμού των πολυπόδων στο παχύ έντερο. Ο ρόλος της ασπιρίνης ως χημειοπροστατευτικού παράγοντα για την πρόληψη ανάπτυξης καρκινώματος του παχέος εντέρου χρειάζεται περαιτέρω εκτίμηση και διερεύνηση. Η πιθανή αυτή αντικαρκινική της ιδιότητα όμως μπορεί να αποδειχθεί «θετική παρενέργεια» σε άτομα που λαμβάνουν ασπιρίνη λόγω αθηρωματικής νόσου των αγγείων<sup>14</sup>.

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

### Α. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Κύριο στοιχείο για την αναγνώριση ομάδων υψηλού κινδύνου αποτελεί το οικογενειακό ιστορικό. Με βάση αυτό, οι πληροφορίες που ενδιαφέρουν είναι α) ο αριθμός των ατόμων στην οικογένεια που έχει τη νόσο, β) η ηλικία που εμφανίστηκε η νόσος στα άτομα αυτά και γ) η ύπαρξη συνδρόμων στην οικογένεια που σχετίζονται με τη νόσο. Τρεις είναι οι κατηγορίες τέτοιων συνδρόμων: 1. Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP), 2. Κληρονομικό μη σχετιζόμενο με πολυποδίαση καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC) ή σύνδρομο Lynch, 3. Κοινή οικογενειακή προδιάθεση για καρκίνωμα του παχέος εντέρου.

Βέβαια, τα μέλη των οικογενειών που εμφανίζουν ένα από τα προηγούμενα σύνδρομα αποτελούν ομάδα αυξημένου κινδύνου για εμφάνιση καρκινώματος στο παχύ έντερο, όμως, το χαμηλό ποσοστό επίπτωσης αυτών των συνδρόμων, δεν επιτρέπει τη μείωση των συνολικών θανάτων από τη νόσο με έλεγχο μόνο αυτών των ομάδων<sup>14</sup>.

### **Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP)**

Οι πρώτοι υποψήφιοι για να αναπτύξουν καρκίνωμα στο παχύ έντερο είναι αυτοί που πάσχουν από το σύνδρομο της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης, μία γενετικώς μεταβιβαζόμενη νόσο, που οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 5 (5q 21-22, θέση APC-Adenomatous Polyposis Coli). Το γονίδιο κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο τύπο που σημαίνει ότι το 100% των φορέων θα εμφανίσουν τη νόσο και έχουν πιθανότητες να τη μεταβιβάσουν στο 50% των απογόνων τους. Ο έλεγχος των πιθανών φορέων γίνεται με ανίχνευση του 5q21APC γονιδίου ή με ανίχνευση του κολοβώματος της APC πρωτεΐνης σε κύτταρα του αίματος, μέθοδος που είναι ήδη σε ευρεία χρήση.

Στην πραγματικότητα πρόκειται για φάσμα συνδρόμων, με διάφορες εξωεντερικές εκδηλώσεις, που κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η εμφάνιση πολυάριθμων αδενωματωδών πολυπόδων (>100) στο παχύ έντερο που κάποιοι απ' αυτούς αυξανόμενοι προοδευτικώς σε μέγεθος θα αναπτυχθούν σε καρκίνωμα. Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης των πολυπόδων είναι τα 16 έτη, η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου τα 29 έτη και ο μέσος όρος ανάπτυξης καρκινώματος στο παχύ έντερο τα 39 έτη. Η ανάπτυξη έστω και μικρότερου αριθμού πολυπόδων σε μέλος οικογένειας με οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση αρκεί για να χαρακτηριστεί το άτομο ως πάσχον από τη νόσο.

Τα επιμέρους σύνδρομα που περιλαμβάνονται στο φάσμα της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης είναι:

- α) Σύνδρομο Gardner - οστεώματα, επιδερμοειδείς κύστες, δεσμοειδείς όγκοι, αδενώματα παχέος εντέρου
- β) Σύνδρομο Turcot - όγκοι εγκεφάλου (γλοίωμα, μυελοβλάστωμα), αδενώματα παχέος εντέρου
- γ) οικογενής πολυποδίαση του παχέος εντέρου
- δ) εξασθενημένη αδενωματώδης πολυποδίαση – οφείλεται σε μεταλλαγμένα APC γονίδια με μειωμένη δραστηριότητα και γενετική διαπερατότητα και εκδηλώνεται με μικρότερο αριθμό αδενωματωδών πολυπόδων που εξαλάσσονται σε καρκινώματα σε μεγαλύτερη μέση ηλικία (54 έτη). Πρόκειται δηλαδή για «στίγματα» της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης<sup>14</sup>.

### **Κληρονομικό μη σχετιζόμενο με πολυποδίαση καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC or Lynch syndromes)**

Πρόκειται για οικογενές σύνδρομο καρκινώματος του παχέος εντέρου που κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο τύπο και σχετίζεται με πολλαπλά πρωτοπαθή καρκινώματα παχέος εντέρου σε μικρότερη ηλικία από το συνήθη μέσο όρο, σύγχρονα και μετάρχονα, με προτίμηση στο δεξιό κόλον<sup>18</sup>. Η προδιάθεση για την ανάπτυξη καρκινωμάτων οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη οποιουδήποτε από τα λεγόμενα mismatch repair genes (MSH2, PMS1, MLH1, PMS2) που βρίσκονται στα χρωμοσώματα 2p (τα δύο πρώτα), 3p και 7, αντίστοιχα. Σε 80-90% των περιπτώσεων τα μεταλλαγμένα γονίδια είναι τα MSH2

και MLH1<sup>19</sup>. Ο γενετικός έλεγχος γίνεται με ανάλυση του DNA σε περιφερικά λεμφοκύτταρα και οι φορείς των μεταλλαγμένων γονιδίων έχουν 78% πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος στο παχύ έντερο κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Υπάρχουν δύο υποκατηγορίες του συνδρόμου:

#### *Σύνδρομο Lynch I*

Παρατηρείται πρόωμη εμφάνιση καρκινωμάτων στο παχύ έντερο (μέση ηλικία 40 έτη) χωρίς πολλαπλή πολυποδίαση, 60-80% των οποίων εμφανίζονται κεντρικότερα της σπληνικής καμπής. Η θέση εμφάνισης των καρκινωμάτων είναι ειδική για τα μέλη της ίδιας οικογένειας. Εμφάνιση σύγχρονων καρκινωμάτων παρατηρείται σε ποσοστό 18%, με αυξημένη συχνότητα βλεννώδους τύπου (35-40%) και η πιθανότητα μετάχρονων καρκινωμάτων είναι 3-5% ανά έτος<sup>14</sup>.

#### *Σύνδρομο Lynch II*

Παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου Lynch I και επιπρόσθετα αυξημένη συχνότητα και πρόωμη εμφάνιση αδενοκαρκινωμάτων σε άλλα όργανα (τα συχνότερα είναι ενδομήτριο, ωθήκες, στόμαχος, λεπτό έντερο)<sup>14</sup>.

Τα σύνδρομα Lynch I και II αποτελούν τους πιο συχνούς τύπους κληρονομικού καρκινώματος του παχέος εντέρου με ποσοστό εμφάνισης 3-6% του συνόλου των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρείται διάχυτη πολυποδίαση σε αυτά τα σύνδρομα, τα καρκινώματα αναπτύσσονται σε προϋπάρχοντα αδενώματα και φαίνεται να ακολουθούν το τυπικό μονοπάτι μετάπτωσης ενός αδενώματος σε καρκίνωμα. Έχουν όμως καλύτερη πρόγνωση από τα σποραδικά καρκινώματα παρά την πολλαπλή τους εντόπιση. Σύμφωνα με τα κριτήρια του Amsterdam<sup>20</sup> η διάγνωση του HNPCC απαιτεί 1) τρεις ή περισσότερους συγγενείς με διαγνωσμένο καρκίνωμα παχέος εντέρου εκ των οποίων ο ένας να έχει πρώτου βαθμού συγγένεια με τους άλλους δύο και 2) τη συμμετοχή δύο τουλάχιστον γενεών με ένα ή περισσότερα άτομα που νόσησαν σε ηλικία μικρότερη από τα 50 έτη.

#### **Κοινή οικογενειακή προδιάθεση για καρκίνωμα του παχέος εντέρου**

Σύμφωνα με εκτιμήσεις, η πιθανότητα εμφάνισης καρκινώματος του παχέος εντέρου σε ένα άτομο είναι αυξημένη όταν υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό, χωρίς να οφείλεται σε εμφανή μοντέλα κληρονομικότητας που ακολουθούν τους κανόνες του Mendel. Από τα στοιχεία διεθνών επιδημιολογικών μελετών σε



πληθυσμούς που μεταναστεύουν υπάρχει η ένδειξη ότι τον κυριότερο ρόλο στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου παίζουν περιβαλλοντικοί παράγοντες. Παρ' όλα αυτά, μεταξύ πληθυσμών υψηλού κινδύνου υπάρχουν οικογενειακοί παράγοντες που προσδίδουν διαφορετική επιδεκτικότητα στον περιβαλλοντικό κίνδυνο. Η πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου αυξάνει ως 3.5 φορές με έναν συγγενή πρώτου βαθμού που πάσχει από τη νόσο και φτάνει στο 5.7% με δύο συγγενείς πρώτου βαθμού (στο γενικό πληθυσμό είναι περίπου 0,04-0,05%), κυρίως όταν έχει εμφανισθεί σε άτομο της οικογένειας μικρότερο των 55 ετών<sup>21</sup>. Επίσης, το θετικό οικογενειακό ιστορικό προδιαθέτει για εμφάνιση της νόσου σε νεαρή ηλικία ή για εμφάνιση σύγχρονων καρκινωμάτων<sup>22</sup>. Αυτά πιθανόν να σημαίνουν ότι υπάρχει κάποιος κληρονομικός παράγοντας που προκαλεί επιδεκτικότητα στην έναρξη της νεοπλασματικής εκτροπής. Μια πιθανή θεωρία είναι ότι σε έδαφος κάποιας κληρονομούμενης γενετικής μετάλλαξης, μία νέα προστιθέμενη σωματική μετάλλαξη, δρα θετικώς στην έναρξη της νεοπλασματικής εκτροπής.

### **Καρκίνωμα παχέος εντέρου σε κληρονομικά σύνδρομα μη-αδενωματώδους πολυποδίασης**

Το σύνδρομο της νεανικής πολυποδίασης εκδηλώνεται στην παιδική ηλικία με μη-νεοπλασματικούς (αμαρτωματώδεις) πολύποδες και διαφέρει σαφώς από την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση που εκδηλώνεται στην εφηβική ηλικία. Σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος στο παχύ έντερο και σε άλλους ιστούς. Μερικοί από αυτούς τους πολύποδες μπορεί να περιέχουν αδενωματώδη ιστό και η πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος σχετίζεται άμεσα με το ποσοστό του αδενωματώδους στοιχείου<sup>14</sup>.

Το σύνδρομο *Peutz-Jeghers* χαρακτηρίζεται από αμαρτωματώδεις πολύποδες από λείες μυϊκές ίνες στο γαστρεντερικό σωλήνα και μελάγχρωση του δέρματος. Σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος στον υπερκείμενο και παρακείμενο των πολυπόδων βλεννογόνο αλλά και καρκινωμάτων σε άλλα όργανα (μαστός, ωοθήκες, όρχεις, τράχηλος, πάγκρεας, χοληφόρα, θυρεοειδής, πνεύμονες, δέρμα)<sup>14</sup>.

## **B. ΗΑΙΚΙΑ**

Ο κυριότερος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για το καρκίνωμα του παχέος εντέρου είναι η ηλικία. Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, ασθενείς ηλικίας κάτω των 40 ετών είναι σχετικά απίθανο να νοσήσουν εκτός αν πάσχουν από ένα από τα προαναφερθέντα σύνδρομα (FAP, HNPCC). Από την ηλικία των 50 και άνω ο κίνδυνος αυξάνει απότομα και συνεχίζεται για κάθε επιπλέον δεκαετία έτσι ώστε στην ηλικία των >85 είναι 10 φορές μεγαλύτερος από την ηλικία των 50.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου κατά ηλικία ανά 10<sup>5</sup> του πληθυσμού

ΗΛΙΚΙΑ	ΑΝΔΡΕΣ	ΓΥΝΑΙΚΕΣ
0-4	0.0	0.0
5-9	0.0	0.0
10-14	0.0	0.0
15-19	0.2	0.1
20-24	0.4	0.4
25-29	1.2	1.1
30-34	2.5	2.4
35-39	5.9	5.9
40-44	12.3	11.9
45-49	27.7	24.6
50-54	57.2	46.3
55-59	102.6	76.7
60-64	164.9	105.7
65-69	243.9	155.5
70-74	320.5	226.9
75-79	411.3	293.6
80-84	463.5	365.5
85+	497.6	391.5

From Eddy DM. Screening for colorectal cancer. Ann Intern Med 1990; 113: 373.

### Γ. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΟΥ ΑΔΕΝΩΜΑΤΟΣ Η ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Οι ασθενείς με αδενωματώδεις πολύποδες αποτελούν ομάδα αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης καρκινώματος σε οποιοδήποτε σημείο του παχέος εντέρου. Ο κίνδυνος εξαρτάται από τον αριθμό, το μέγεθος και την ιστολογία των πολυπόδων. Πολύποδες με μέγεθος <1cm δεν αποτελούν παράγοντα αυξημένου κινδύνου ενώ η πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό υπολογίζεται ότι αυξάνει κατά 2.1 φορές μετά αφαίρεση αδενώματος με μέγεθος 1-2cm και 2.6 φορές όταν το αδένωμα έχει μέγεθος >2cm. Ανάλογα, η πιθανότητα είναι 3.8 φορές μεγαλύτερη για αφαίρεση αδενώματος με λαχνωτή διαμόρφωση έως 5,1 φορές όταν το αδένωμα περιέχει εστίες σοβαρής δυσπλασίας (carcinoma in situ). Φτάνει δε ως 5.9 όταν το αδένωμα είναι >2cm, λαχνωτό και με σοβαρή δυσπλασία.

Επίσης, οι ασθενείς με προηγούμενο καρκίνωμα στο παχύ έντερο έχουν πιθανότητα περίπου 5% να αναπτύξουν μετάχρονο καρκίνωμα. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από το μήκος του παχέος εντέρου που αφαιρέθηκε στην πρώτη επέμβαση και τη διάρκεια της μετεγχειρητικής παρακολούθησης<sup>14</sup>.

### Δ. ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΕΙΕΣ

Ομάδα αυξημένου κινδύνου αποτελούν επίσης και οι ασθενείς που πάσχουν από φλεγμονώδη νόσο του παχέος εντέρου, με επίπτωση που φθάνει στο 10%

στους ασθενείς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα και εμφάνιση του καρκινώματος σε σχετικά νεαρές ηλικίες. Κρίσιμος παράγοντας είναι η διάρκεια και η έκταση της φλεγμονώδους νόσου. Έτσι, η επίπτωση είναι 1% στην πρώτη δεκαετία της νόσου, 7% στη δεύτερη, 16% στην τρίτη και 53% στην τέταρτη καθώς επίσης 13% σε πανκολίτιδα και 5% σε εντόπιση της νόσου μόνο στο αριστερό κόλον. Οι ασθενείς με νόσο του Crohn έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος αλλά σε μικρότερο ποσοστό από αυτούς με ελκώδη κολίτιδα και κυρίως στις περιοχές ουλώδους στένωσης και σε περιπρωκτικά συρίγγια.

Η επιβίωση των ασθενών που αναπτύσσουν καρκίνωμα παχέος εντέρου σε έδαφος ελκώδους κολίτιδας είναι παρόμοια με αυτή των σποραδικών καρκινωμάτων. Αυτό είναι απογοητευτικό αν σκεφτούμε ότι οι ασθενείς αυτοί υποβάλλονται σε συνεχή παρακολούθηση. Φαίνεται όμως ότι η φυσική ιστορία αυτών των καρκινωμάτων είναι διαφορετική από τα σποραδικά.

Η αναγνώριση πρώιμων νεοπλασματικών βλαβών στο βλεννογόνο είναι απαραίτητη για τον νωρίτερο εντοπισμό των όγκων στους ασθενείς που πάσχουν από φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. Η δυσπλασία είναι ο καλύτερος δείκτης για πρώιμο καρκίνωμα σε αυτούς τους ασθενείς. Η δημιουργία κριτηρίων αναγνώρισης και κατάταξης της δυσπλασίας ήταν ένα σημαντικό βήμα, καθώς η διαδικασία της συνεχούς φλεγμονής και επούλωσης μπορεί να προκαλέσει σύγχυση με πρώιμη νεοπλασία. Η χαμηλού βαθμού δυσπλασία σε δείγμα βιοψίας μπορεί να σημαίνει είτε φλεγμονώδη διαδικασία, είτε την παρουσία σοβαρότερης παρακείμενης βλάβης, είτε τέλος να είναι προάγγελος επιπρόσθετων νεοπλασματικών βλαβών σε άλλες θέσεις. Η παρουσία δυσπλασίας σε επηρμένη βλάβη είναι ιδιαίτερα ανησυχητική και η σοβαρή δυσπλασία αποτελεί εύρημα που αποτελεί ισχυρό κριτήριο για ολική κολεκτομή<sup>14</sup>.

#### **E. ΑΛΛΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ**

Διάφορες άλλες καταστάσεις έχουν σχετισθεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκινώματος στο παχύ έντερο. Η δίαιτα με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος, χαρακτηριστική του δυτικού κόσμου, ενέχεται στην παθογένεση της νόσου, όμως, δεν μπορεί να χρησιμεύσει ως στοιχείο που να ξεχωρίζει ομάδες ατόμων που χρειάζονται αυξημένη παρακολούθηση. Η πιθανή σχέση της

χολοκυστεκτομής με τη νόσο δεν είναι αποδειγμένη. Η ακρομεγαλία και το σύνδρομο Bloom (συγγενής νανισμός και υπερευαισθησία στην ηλιακή ακτινοβολία) σχετίζονται με τη νόσο, η συχνότητά τους όμως είναι τόσο μικρή ώστε η παρακολούθηση των ασθενών δεν προσφέρει στη μείωση των θανάτων από το καρκίνωμα<sup>14</sup>.

## **ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

Η βασική δομή του παχέος εντέρου είναι ουσιαστικώς παρόμοια με τη δομή της υπόλοιπης γαστρεντερικής οδού που είναι ένας μυϊκός σωλήνας που επικαλύπτεται στο εσωτερικό του από βλεννογόνο. Διακρίνονται τέσσερις στιβάδες εκ των έσω προς τα έξω: βλεννογόνος, υποβλεννογόνιος, μυϊκή και ορογόνος.

Ο βλεννογόνος αποτελείται από τρία στρώματα: το επιθήλιο, τη βασική μεμβράνη από σθηκτικό συνδετικό ιστό και το βλεννογόνο μυϊκό χιτώνα που είναι λεπτή στιβάδα από λείες μυϊκές ίνες που χρησιμεύει για τις τοπικές κινήσεις και την αναδίπλωση του βλεννογόνου.

Ο υποβλεννογόνιος αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό που στηρίζει το βλεννογόνο και περιέχει αγγεία και νεύρα.

Το μυϊκό τοίχωμα αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες και αποτελείται από δύο χιτώνες, τον εσωτερικό κυκλοτερή και τον εξωτερικό επιμήκη. Χρησιμεύει για τις περισταλτικές κινήσεις του παχέος εντέρου.

Ο ορογόνος αποτελείται από ισχυρό συνδετικό ιστό που επικαλύπτεται από μεσοθήλιο και δεν καλύπτει όλη την εξωτερική επιφάνεια του παχέος εντέρου. Στα τμήματα του ανιόντος κόλου, κατιόντος κόλου και ορθού που λείπει ο ορογόνος, το μυϊκό τοίχωμα έρχεται σε απ' ευθείας επαφή με το γύρω χαλαρό συνδετικό ιστό του οπισθίου κοιλιακού τοιχώματος και της πυέλου.

Τα νεύρα, που προέρχονται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, σχηματίζουν δύο πλέγματα, το μεντερικό του Auerbach και το υποβλεννογόνο του Meissner.

Λεμφικός ιστός υπάρχει σε όλο το μήκος του παχέος εντέρου, είτε ως διάχτυα σκορπισμένα κύτταρα κυρίως στη βασική μεμβράνη, είτε με τη μορφή λεμφοζιδίων στον υποβλεννογόνιο χιτώνα.

Ο φυσιολογικός βλεννογόνος του παχέος εντέρου καλύπτεται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο που παρουσιάζει πολυάριθμες καταδύσεις στον υποβλεννογόνιο που ονομάζονται κρύπτες. Σύμφωνα με τη λειτουργία του παχέος εντέρου που είναι η απορρόφηση ύδατος και η έκκριση βλέννης για τη λείανση των κοπράνων, στις κρύπτες συναντώνται δύο τύποι κυττάρων αντίστοιχα: τα απορροφητικά και τα καλυκοειδή.

Τα επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κρυπτών απομακρύνονται μετά το θάνατό τους, όπως ακριβώς συμβαίνει και στο δέρμα. Η αντικατάστασή τους γίνεται από κύτταρα στη βάση των κρυπτών που διαιρούνται και σταδιακά μεταναστεύουν προς την επιφάνεια από το πλάγιο τοίχωμα των κρυπτών. Κατά τη μετανάστευση επέρχεται η διαφοροποίησή τους, αποκτούν δηλαδή την ικανότητα να απορροφούν νερό και άλλα στοιχεία και να εκκρίνουν βλέννη. Τελικώς, τα διαφοροποιημένα κύτταρα αντικαθιστούν τους προγόνους τους στο ανώτερο τριτημόριο των κρυπτών και την επιφάνεια του επιθηλίου.

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου προέρχονται από το επιθήλιο του βλεννογόνου. Κατά την αύξησή τους καταστρέφουν το γύρω φυσιολογικό επιθήλιο και επεκτείνονται διηθητικά στους υπόλοιπους χιτώνες του εντέρου.

### **Μακροσκοπική εικόνα**

Διακρίνονται μακροσκοπικά σε 4 τύπους. 1) ελκωτικά - διηθητικά, 2) εξωφυτικά, 3) δακτυλιοειδή - στενωτικά και 4) διάχυτα διηθητικά (τύπου πλαστικής λινίτιδας).

Τα ελκωτικά - διηθητικά καρκινώματα αποτελούν το συχνότερο τύπο, εντοπίζονται συνήθως στο εγκάρσιο και αριστερό κόλον και επεκτείνονται διατοιχωματικά (ενδοτοιχωματική μάζα μεγαλύτερη ή ίση της ενδοαυλικής).

Τα εξωφυτικά παρατηρούνται συχνότερα στο τυφλό και ανιόν. Καταλαμβάνουν μεγάλο τμήμα του εντερικού αυλού (ενδοαυλική μάζα > ενδοτοιχωματικής) και εμφανίζουν καλή διαφοροποίηση.

Τα δακτυλιοειδή - στενωτικά καρκινώματα εντοπίζονται συνήθως στο εγκάρσιο και κατιόν και η αρχική τοπική τους διήθηση καταλήγει σε δακτυλιοειδή κατάληψη του εντερικού αυλού. Χαρακτηριστικό τους είναι η πάχυνση του τοιχώματος και η εξάλειψη του μυϊκού χιτώνα. Βέβαια, στενωτική βλάβη δημιουργείται και από την κυκλοτερή επέκταση ελκωτικού - διηθητικού τύπου καρκινώματος, που απεικονιστικά (με το βαριούχο υποκλυσμό) έχει τη χαρακτηριστική εικόνα “φαγωμένου μήλου”.

Ο διάχυτα διηθητικός σκιρρώδης τύπος είναι σπάνιος και αποτελεί συνήθως μετάσταση από καρκίνωμα του στομάχου.

Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά με ιδιαίτερη σημασία είναι: α) η καλή συσχέτιση μακροσκοπικών και μικροσκοπικών ορίων διότι σπάνια εμφανίζουν υποβλεννογόνια ή ενδοτοιχωματική επέκταση πέραν των μακροσκοπικών ορίων και β) η μικρή συχνότητα παλίνδρομης ενδοτοιχωματικής επέκτασης.

Παλαιότερα, το 75% των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου εντοπιζόταν στο ορθό και σιγμοειδές. Σύμφωνα με νεώτερα δεδομένα υπάρχει τάση μετατόπισης της συχνότητας της νόσου προς το δεξιό κόλον<sup>23</sup>. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην αύξηση του μέσου όρου επιβίωσης καθότι οι βλάβες στο κεντρικό τμήμα του

παχέος εντέρου είναι συχνότερες σε ηλικίες άνω των 65 ετών. Ίσως όμως ενέχονται και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως επίσης και το γεγονός ότι η εφαρμογή της εκτομής πολυπόδων που παρατηρούνται κατά τον προληπτικό έλεγχο με κολonosκόπηση και η οποία προλαμβάνει τη μετέπειτα εξέλιξή τους σε καρκίνωμα, είναι αποτελεσματικότερη στο αριστερό κόλον.

### **Μικροσκοπική εικόνα**

Κατά τη μικροσκοπική εξέταση η πλειοψηφία των κακοηθών όγκων του παχέος εντέρου είναι αδενοκαρκινώματα. Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου είναι κακώθης νεόπλασμα του αδενικού επιθηλίου που αποτελείται από σωληνώδεις, κυψελιδόμορφες και θηλώδεις βλάστες. Η αρχιτεκτονική του νεοπλάσματος και σε μικρότερο βαθμό τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά καθορίζουν τη διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου να διακρίνονται σε:

- 1) ανώτερης διαφοροποίησης (χαμηλής κακοήθειας)
- 2) μέτριας διαφοροποίησης (μέσης κακοήθειας)
- 3) κατώτερης διαφοροποίησης (υψηλής κακοήθειας)

Ο βαθμός διαφοροποίησης σχετίζεται με την πρόγνωση και την πενταετή επιβίωση των ασθενών, που είναι 80%, 60% και 25% για τα καλής, μέσης και χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα αντίστοιχα.

### **Ιστολογικοί τύποι**

Ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος είναι το αδενοκαρκίνωμα. Η διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων του επιθηλίου προς διαφορετικούς τύπους κυττάρων δίνει γένεση σε ποικίλους άλλους ιστολογικούς τύπους όπως:

- 1) Βλενώδες αδενοκαρκίνωμα (συχνότητα 10-15%) αποτελούμενο από λίμνες βλέννης σε ποσοστό τουλάχιστον 50% αναμειγμένες με αθροίσεις νεοπλασματικών κυττάρων.
- 2) Αδενοκαρκίνωμα από βλενώδη κύτταρα τύπου σφραγιστήρος δακτυλίου (signet-ring cells).
- 3) Καρκίνωμα με ακανθοκυτταρική διαφοροποίηση α) αδενοακανθοκυτταρικό καρκίνωμα και β) αμιγώς ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (στο ορθό).
- 4) Αμαρογενές καρκίνωμα (στο ορθό).
- 5) Καρκίνωμα με διαφοροποίηση προς χοριοκαρκίνωμα.

6) Καρκίνωμα με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση

α) παρουσία μεμονωμένων ενδοκρινικών κυττάρων

β) μικτοί όγκοι καρκινώματος-καρκινοειδούς

γ) μικροκυτταρικό καρκίνωμα (συχνότης <1%)

Ο καθορισμός του ιστολογικού τύπου στις παραπάνω περιπτώσεις έχει σημασία διότι σχετίζεται με την πρόγνωση. Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα, το καρκίνωμα με κύτταρα «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» και το βλενώδες σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση λόγω των πρώιμων λεμφαδενικών και απομακρυσμένων μεταστάσεων<sup>24</sup>.

Η μελέτη του καρκινώματος του παχέος εντέρου από τον παθολογοανατόμο περιλαμβάνει τον καθορισμό των εξής παραμέτρων:

Ιστολογικό τύπο

Διαφοροποίηση,

Τύπο νεοπλασματικού ορίου (επεκτατικό ή διηθητικό),

Ύπαρξη λεμφοκυτταρικής αντίδρασης,

Διήθηση εξωτοιχωματικής φλέβας,

Σταδιοποίηση: α. διήθηση τοιχώματος

β. εξωτοιχωματική επέκταση

γ. διήθηση λεμφαδένων (θέση - αριθμός)

Η μελέτη με νεώτερες μεθόδους (κυτταρομετρία ροής, ανοσοϊστοχημική ανίχνευση αντιγόνων διαφοροποίησης και ογκοσυσχετιζόμενων) συμβάλλει στη διερεύνηση της ιστογένεσης, στην καλύτερη εκτίμηση της διαφοροποίησης, στην ανάδειξη της νεοπλασματικής ετερογένειας και στην κατανόηση των μηχανισμών της τοπικής και μεταστατικής διήθησης.

### **Επέκταση-Μετάσταση**

Η επέκταση του καρκινώματος του παχέος εντέρου γίνεται τόσο ενδοαυλικώς, κατά την επιμήκη ή την εγκάρσια διάμετρο καταστρέφοντας το παρακείμενο φυσιολογικό επιθήλιο όσο και σε βάθος, διηθώντας κατά συνέχεια τους χιτώνες του εντέρου.

Η μετάσταση γίνεται: 1. Κατά συνέχεια ιστών, 2. Αιματογενώς, με την πυλαία κυκλοφορία (μεσεντέριες φλέβες) και τη συστηματική κυκλοφορία (μέσες και κάτω αιμορροϊδικές φλέβες), 3. Λεμφογενώς, 4. Με ενδοπεριτοναϊκή διασπορά από αποφολίδωση νεοπλασματικών κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα από



όγκο που έχει διηθήσει τον ορογόνο, 5. Με ενδοαυλική διασπορά και 6. Περινευρικά και περιαγγειακά.

## **ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

Σύμφωνα με τις υπάρχουσες θεωρίες τα αδενοκαρκινώματα είτε αναπτύσσονται επί εδάφους προϋπάρχοντος αδενώματος, είτε αυτόματα απ' ευθείας από φυσιολογικό βλεννογόνο (de novo).

### **Ανάπτυξη καρκινώματος μέσω της ακολουθίας “φυσιολογικός βλεννογόνος-αδένωμα –αδενοκαρκίνωμα”.**

Η πρώτη μακροσκοπική βλάβη που αναγνωρίζεται είναι οι «εστίες διαταραχής της μορφολογίας των κρυπτών» (aberrant crypt foci) ή μικροαδενώματα, που συνήθως μοιάζουν σαν σχισμές στο βλεννογόνο. Μικροσκοπικά παρατηρείται επιμήκυνση και πάχυνση των κρυπτών, με αύξηση των διαστάσεων των κυττάρων και διόγκωση του διάμεσου συνδετικού ιστού. Η απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο όπως το WAF1 και το Ki-67 σ' αυτές τις βλάβες και η επακόλουθη απελευθέρωση από τον φυσιολογικό έλεγχο του κύκλου είναι πιθανό ν' απεικονίζει τα πρώτα βήματα της νεοπλασματικής εκτροπής<sup>25</sup>.

Αργότερα αναπτύσσεται πολυποειδής βλάβη, γνωστή ως αδένωμα. Τα αδενώματα του παχέος εντέρου αντιπροσωπεύουν περιοχές ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού του επιθηλίου με σαφή όρια εντός του βλεννογόνου. Η επιφάνεια τους είναι ανώμαλη και το σχήμα τους στρογγυλό ή επίπεδο με βάση ευρεία ή μισχωτή. Με βάση την ιστολογική εικόνα κατατάσσονται σε σωληνώδη, σωληνολαχνωτά και λαχνωτά αδενώματα. Τα σωληνώδη αντιπροσωπεύουν το 65-80% των αδενωμάτων και είναι συνήθως μισχωτά ενώ τα αμιγώς λαχνωτά αντιπροσωπεύουν το 5-10% και έχουν συνήθως ευρεία βάση. Βέβαια, αδενωματώδης αλλοίωση είναι δυνατό να αναπτυχθεί και σε επίπεδο βλεννογόνο, χωρίς μακροσκοπικά ορατή εξωφυτική βλάβη και τότε ονομάζεται «επίπεδο

αδένωμα». Ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης κατατάσσονται σε αδενώματα με ήπια, μέτρια ή σοβαρή δυσπλασία. Η σοβαρή δυσπλασία αντιστοιχεί στην κακοήθεια του επιθηλίου (ενδοεπιθηλιακό ή ενδοβλεννογονικό καρκίνωμα) που δε διηθεί τη βλεννογόνο μυϊκή στιβάδα του εντέρου, που παλαιότερα αναφερόταν με τον όρο “καρκίνωμα in situ”.

Όσο πιο πολύ αυξάνει σε μέγεθος το αδένωμα και όσο πιο αδιαφοροποίητα είναι τα κύτταρά του, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να μεταπέσει σε καρκίνωμα και να επεκταθεί διηθητικά έξω από τη βασική μεμβράνη. Η πιθανότητα να εμπεριέχει καρκίνωμα ένα αδένωμα μεγέθους <1cm είναι περίπου 0.2%, ενώ σε αδένωμα μεγέθους >2cm η πιθανότητα αυξάνει στο 3-16%. Στα καλής διαφοροποίησης καρκινώματα αναγνωρίζονται άτυποι αδενικοί σχηματισμοί. Όσο χαμηλότερη είναι η διαφοροποίηση, τόσο λιγότερο διακρίνονται τέτοιοι σχηματισμοί και τόσο πιο άτυπα είναι τα κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Η ανάπτυξη των περισσότερων αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου φαίνεται ότι συμβαίνει μέσα από την αλληλουχία των συγκεκριμένων αλλοιώσεων που αναφέρθηκαν. Από το φυσιολογικό βλεννογόνο αναπτύσσονται τα αδενώματα και το 20% από αυτά μεταπίπτει σε κακοήγη όγκο, το αδενοκαρκίνωμα<sup>26</sup>. Έτσι, είναι δυνατό να μελετηθούν οι όγκοι αυτοί στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης τους και γι’ αυτό το λόγο αποτελούν ένα ιδανικό σύστημα μελέτης των γενετικών αλλοιώσεων που επισυμβαίνουν κατά τη νεοπλασματική εκτροπή.

Ο ρυθμός αύξησής τους κατά μέσο όρο είναι σχετικά αργός αλλά είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ακριβώς αφού η ανεύρεσή τους θα οδηγήσει τις περισσότερες φορές σε εκτομή (ενδοσκοπική ή χειρουργική). Παρ’ όλα αυτά, τα στοιχεία που υπάρχουν από την προ της κολονοσκόπησης εποχή υποδηλώνουν ότι χρειάζονται περίπου 11 έτη για την ανάπτυξη καρκινώματος επί αδενωμάτων με χαμηλό βαθμό ατυπίας, ενώ τα αδενώματα με σοβαρή ατυπία μεταπίπτουν σε καρκίνωμα περίπου σε 3,5 έτη<sup>27</sup>. Υποθετικά μπορούμε να πούμε ότι για να φτάσει ένας μικροσκοπικός πολύποδας το μέγεθος του ενός εκατοστού χρειάζονται περίπου 2 ως 3 έτη<sup>28</sup>. Βέβαια, υπάρχουν όγκοι που αυξάνονται πολύ γρηγορότερα, αλλά και στον ίδιο όγκο η ταχύτητα ανάπτυξης δεν είναι ομοιογενής σε όλα τα σημεία του εξ αιτίας της κυτταρικής ετερογένειας.

### **Ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος απ' ευθείας από το φυσιολογικό βλεννογόνο (de novo)**

Η πλειοψηφία των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου φαίνεται ότι αναπτύσσονται σε έδαφος προϋπάρχουσας αδενωματώδους πολυποειδούς βλάβης και συνήθως υπόλειμμα του προϋπάρχοντος αδενώματος παρατηρείται σε συνέχεια με το καρκίνωμα. Όμως, σε μερικά καρκινώματα υπάρχει απότομη μετάβαση από το φυσιολογικό βλεννογόνο στο καρκίνωμα χωρίς υπολειπόμενο αδένωμα στα όρια της μετάβασης. Τέτοιες βλάβες θεωρούνται ότι αναπτύσσονται απ' ευθείας από το φυσιολογικό βλεννογόνο χωρίς να μεταβαίνουν από το στάδιο του αδενώματος και ονομάζονται “de novo” αδενοκαρκινώματα.

Ο όρος de novo καρκίνωμα σημαίνει ότι η βλάβη αναπτύσσεται απ' ευθείας από το φυσιολογικό βλεννογόνο. Εν τούτοις, είναι πιθανό να αναπτύσσεται με έναν από τους ακόλουθους μηχανισμούς: Πρώτον, κατά την ανάπτυξή του το καρκίνωμα να καταστρέψει το αδένωμα από το οποίο μπορεί να προήλθε, έτσι ώστε να μην είναι ορατή η πιθανώς προϋπάρχουσα αδενωματώδης αλλοίωση. Δεύτερον, να αναπτύσσεται σε επίπεδο αδένωμα ή σε αδενωματώδη πολύποδα και να αποκτά κακοήγη φαινότυπο πριν αυξηθεί πολύ σε μέγεθος, καταστρέφοντας το προϋπάρχον αδένωμα. Τρίτον, να αναπτύσσεται πράγματι απ' ευθείας από το φυσιολογικό βλεννογόνο. Στην πράξη βέβαια η διάγνωση τέτοιων βλαβών γίνεται βάσει μορφολογικών κριτηρίων στα οποία συμπεριλαμβάνονται: έλλειψη αδενωματώδους στοιχείου, μικρό μέγεθος και διήθηση της υποβλεννογονίου στιβάδος<sup>29</sup>.

Πάντως, επειδή το de novo καρκίνωμα δεν έχει αναγνωριστεί επίσημα ως ξεχωριστός τύπος αδενοκαρκινώματος είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η συχνότητά του επί του συνόλου των αδενοκαρκινωμάτων. Τα ποσοστά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ξεκινούν από 1% και σε μελέτες από την Ιαπωνία φθάνουν μέχρι το 80%. Τα de novo καρκινώματα είναι πιο επιθετικά στη συμπεριφορά τους σε σχέση με τα εξ αδενωμάτων καρκινώματα και πιθανόν αντιπροσωπεύουν μηχανισμούς που οδηγούν σε καρκινωματώδη εξαλλαγή νωρίτερα και γρηγορότερα στη φυσική ιστορία της νεοπλασματικής εκτροπής.

## ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η πρώτη κατάταξη της νόσου σε στάδια ανάλογα με το βαθμό διήθησης από τον όγκο έγινε από τον Dukes, αρχικά για το καρκίνωμα του ορθού και περιελάμβανε τρία στάδια, A, B και C και κατόπιν επικράτησε για τα καρκινώματα όλου του παχέος εντέρου. Σύμφωνα με αυτήν, στο στάδιο A περιλαμβάνονται οι όγκοι που διηθούν έως και τμήμα του μυϊκού χιτώνα, στο στάδιο B οι όγκοι που διηθούν όλο το μυϊκό χιτώνα και τον ορογόνο και επεκτείνονται πέραν αυτού, στο περικολικό λίπος και στο στάδιο C οι όγκοι που έχουν διηθήσει λεμφαδένες του μεσεντερίου. Ακολούθησαν αρκετές τροποποιήσεις και από αυτές, η σταδιοποίηση των Astler και Coller τυγχάνει κοινής αποδοχής και χρησιμοποιείται έως και σήμερα. Σύμφωνα με αυτήν, στο στάδιο A περιλαμβάνονται οι όγκοι που διηθούν από το βλεννογόνο έως και τον υποβλεννογόνο, χωρίς να επεκτείνονται στο μυϊκό χιτώνα, στο στάδιο B1 αυτοί που διηθούν έως και τμήμα του μυϊκού χιτώνα, στο στάδιο B2 αυτοί που διηθούν έως και τον ορογόνο ή και πέραν αυτού, στο στάδιο C1 και C2 οι όγκοι σταδίου B1 και B2 αντίστοιχα που διηθούν και λεμφαδένες και τέλος στο στάδιο D περιλαμβάνονται οι όγκοι που έχουν δώσει απομακρυσμένες μεταστάσεις<sup>30</sup>.

Η ανάγκη για ομοιογενή ιστοπαθολογική κατανομή που είναι πιο χρήσιμη σε κλινικές μελέτες οδήγησε την American Joint Commission on Cancer (AJCC) στην κατάταξη του καρκινώματος του παχέος εντέρου σύμφωνα με το σύστημα TNM που είναι η εξής:

*T (tumor): Πρωτοπαθής εστία*

- To: Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς εστίας του όγκου.
- Tx: Δεν υπάρχει δυνατότητα εκτίμησης της έκτασης του όγκου.
- Tis: Καρκίνωμα in situ
- T1: Όγκος περιοριζόμενος στο βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο
- T2: Όγκος περιοριζόμενος στο εντερικό τοίχωμα χωρίς διήθηση του ορογόνου
- T3: Διήθηση του ορογόνου με ή χωρίς επέκταση σε παρακείμενους ιστούς
- T4: Επέκταση σε παρακείμενους ιστούς και όργανα

*N (nodes): Λεμφαδένες*

- No: Απουσία διήθησης λεμφαδένων

- Nx: Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν  
 N1: Διήθηση 1 ως 3 περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων  
 N2: Διήθηση 4 ή περισσότερων περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων  
 N3: Διήθηση λεμφαδένων πέραν των περικολικών ή περιορθικών

*M (metastases): Μεταστάσεις*

- Mx: Η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί  
 Mo: Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων  
 M1: Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η σταδιοποίηση σε IV στάδια σύμφωνα με το σύστημα TNM, η σταδιοποίηση κατά Dukes' και Astler-Coller καθώς και η πενταετής επιβίωση για κάθε στάδιο. Είναι εμφανές ότι η πρόγνωση είναι

Πίνακας 2		
Πενταετής επιβίωση κατά στάδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου		
ΣΤΑΔΙΟ	ΔΙΗΘΗΣΗ	ΠΕΝΤΑΕΤΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΟΡΘΟΥ (%)
Dukes		
A	υποβλεννογόνιος-	85
B	περιορθικά	64
C	λειμοαδένες	33
Astler-Coller		
A	ενδοβλεννογονικός	100
B1	ιυικός γιτόνας	67
B2	περιορθικά	54
C1	B1 + λειμοαδένες	43
C2	B2 + λειμοαδένες	22
TNM		
0	Tis No Mo	100
I	T1 No Mo	100
	T2 No Mo	85
II	T3 No Mo	70
	T4 No Mo	30
III	οποιοδήποτε T N1	60
	οποιοδήποτε T N2	30
IV	οποιοδήποτε T ή N	3
Fisher ER, Sass R, et al. Dukes' classification revisited. Findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects (protocol R-01). Cancer 1989; 64: 2354.		

πτωχότερη όσο αυξάνει το στάδιο<sup>31</sup>.

Επιπρόσθετες παράμετροι που σχετίζονται με την πρόγνωση λαμβάνονται υπ'όψη από τον Jass και σύμφωνα με αυτήν το στάδιο καθορίζεται από το άθροισμα των βαθμών που λαμβάνεται για κάθε μία από τις παρακάτω παραμέτρους: α) αριθμός λεμφαδένων με μεταστατική διήθηση, β) παρουσία λεμφοκυτταρικής-πλασματοκυτταρικής αντίδρασης στο διηθητικό όριο του όγκου, γ) ύπαρξη διηθητικού ή επεκτατικού ορίου και δ) επέκτασης πέραν του εντερικού τοιχώματος. Παρά το

γεγονός ότι έχει προγνωστική αξία, η σταδιοποίηση κατά Jass δεν έχει τύχει ευρείας εφαρμογής<sup>14</sup>.

Με την πρόοδο της μοριακής βιολογίας, ίσως κάποια νέα σταδιοποίηση που θα βασίζεται στο είδος και τον αριθμό των γενετικών αλλοιώσεων στον όγκο σε συσχέτιση με τα συμβατικά συστήματα σταδιοποίησης να έχει μεγαλύτερη προγνωστική αξία<sup>32</sup>.

## ***B' ΜΕΡΟΣ***

## **ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΕΞΑΛΛΑΓΗΣ**

### **ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ**

Η νεοπλασματική εξαλλαγή είναι μία δυναμική, πολυσταδιακή διαδικασία μετατροπής φυσιολογικών κυττάρων σε νεοπλασματικά. Γενικά διακρίνονται δύο φάσεις: έναρξη και προαγωγή.

A) Έναρξη: Αναφέρεται στην επαγωγή μη-αναστρέψιμων αλλοιώσεων στο κυτταρικό γονιδίωμα. Παρά την παρουσία αυτών των αλλοιώσεων τα κύτταρα δεν είναι ακόμα εξαλλαγμένα, δεν έχουν αυτονομία ανάπτυξης, ούτε μοναδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Αποτελεί όμως μεταβατική φάση, ευνοϊκή για την ανάπτυξη εξαλλαγμένων κυτταρικών μορφών αν σε αυτή τη χρονική περίοδο δράσουν κατάλληλοι παράγοντες.

B) Προαγωγή: Αναφέρεται στην επαγωγή αλλοιώσεων που οδηγούν σε εξαλλαγμένες κυτταρικές μορφές (νεοπλασματικά κύτταρα). Προϋπόθεση για τη δυνατότητα νεοπλασματικής εξαλλαγής σ' αυτή τη φάση αποτελεί η προηγούμενη φάση της έναρξης, όπου μη-αναστρέψιμες αλλοιώσεις του κυτταρικού γονιδιώματος προκλήθηκαν από άλλους παράγοντες.

Μέσα από αυτές τις μεταβολές δημιουργούνται κύτταρα με μη φυσιολογικό φαινότυπο. Από αυτά θα επικρατήσουν εκείνα που έχουν αποκτήσει πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των γύρω φυσιολογικών κυττάρων. Εν συνεχεία δημιουργούνται κατά τον ίδιο τρόπο νέοι κλώνοι κυττάρων με αλλοιώσεις που προκαλούν ακόμα μεγαλύτερο πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των προηγούμενων και εμφανίζουν περισσότερο ανώμαλο φαινότυπο, ως τη δημιουργία των κυττάρων με κακοήθη φαινότυπο.

Αποτέλεσμα δηλαδή αυτής της δυναμικής διαδικασίας κυτταρικών και μοριακών μετασχηματισμών είναι η ανάδυση ενός ή πολλών κυτταρικών κλώνων με αυτόνομη ανάπτυξη, η οποία δεν ελέγχεται από τους φυσιολογικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και οδηγεί στη δημιουργία κακοήθους νεοπλασίας<sup>33</sup>.

#### ***Ογκογενετικοί παράγοντες***



Συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στη διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής. Χωρίζονται σε φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς.

### 1) Φυσικοί παράγοντες

Οι υπεριώδεις, ηλεκτρομαγνητικές και σωματιδιακές ακτινοβολίες. Οι υπεριώδεις ηλιακές ακτινοβολίες προκαλούν καρκινώματα και μελανώματα στο δέρμα. Η δράση τους εξασκείται μέσω πρόκλησης βλαβών στο DNA των κυττάρων και μέσω ανοσοκατασταλτικής δράσης στον οργανισμό. Οι ηλεκτρομαγνητικές και σωματιδιακές ακτινοβολίες προκαλούν κυρίως λευχαιμίες και καρκινώματα θυρεοειδούς. Η δράση τους εξασκείται μέσω μεταλλάξεων στο κυτταρικό DNA.

### 2) Χημικοί παράγοντες

Οι περισσότεροι αναφέρονται ως προ-καρκινογόνοι παράγοντες γιατί απαιτείται μεταβολική ενεργοποίησή τους *in vivo* πριν αποκτήσουν τη δυνατότητα δράσης ως καρκινογόνα. Μόνο λίγοι χημικοί παράγοντες δρουν άμεσα ως καρκινογόνα. Οι χημικοί παράγοντες εξασκούν ογκογενετική δράση μέσω πρόκλησης μεταλλάξεων στο DNA των κυττάρων ή μέσω ενεργοποίησης κυτταρικών κυκλωμάτων που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική διαφοροποίηση.

Οι κυριότεροι χημικοί παράγοντες που συμμετέχουν ή που επάγουν τη διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής είναι:

α) Αλκυλιούντες παράγοντες: Χρησιμοποιούνται και ως αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά. Μπορούν να επάγουν δευτερογενή νεοπλασματική εξαλλαγή.

β) Αρωματικοί υδρογονάνθρακες: Βρίσκονται στον καπνό των τσιγάρων.

γ) Χρώματα ανιλίνης: Προκαλούν καρκίωμα ουροδόχου κύστης στους εργαζόμενους σε βιομηχανίες παραγωγής τέτοιων χρωστικών ουσιών.

δ) Βινυλοχλωρίδιο και νικέλιο μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο στους εργαζόμενους σε βιομηχανίες επεξεργασίας τέτοιων υλικών.

### 3) Βιολογικοί παράγοντες

Είναι οι DNA και οι RNA ιοί.

## *DNA ιοί*

Οι πιο σημαντικοί για την ανθρώπινη παθολογία είναι οι HPV (Human Papilloma Virus), EBV (Epstein-Barr Virus) και HBV (Hepatitis-B Virus). Οι ανωτέρω ιοί έχουν σημαντική συμμετοχή στη δημιουργία νεοπλασιών σε ανθρώπους.

HPV: Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί 70 γενετικά διαφορετικοί υπότυποι του ιού. Οι υπότυποι 1,2,4 και 7 βρίσκονται συχνά σε καλοήγη θηλώματα από καλυπτήριο επιθήλιο. Οι υπότυποι 16 και 18 βρίσκονται στο 50% των περιπτώσεων καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας και θεωρούνται υψηλού κινδύνου, ενώ βρέθηκαν επίσης και σε 50% και 40% της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας τραχήλου CIN II και CIN III, αντίστοιχα. Οι υπότυποι 31 και 33 θεωρούνται ενδιάμεσου κινδύνου και έχουν βρεθεί σε 25% των CIN II και CIN III και σε 10% των καρκινωμάτων. Οι υπότυποι 6 και 11 θεωρούνται χαμηλού κινδύνου και έχουν βρεθεί στο 20% των CIN I και CIN II αλλά όχι σε καρκινώματα τραχήλου μήτρας.

EBV: Ανήκει στην κατηγορία των ερπητοϊών και σχετίζεται με το ενδημικό λέμφωμα Burkitt της Αφρικής και το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα στην Κίνα, κυρίως το αδιαφοροποίητο ιστολογικά. Τελευταία αναφέρεται συσχέτιση με τη νόσο Hodgkin και τα T-λεμφώματα του ρινοφάρυγγα.

HBV: Αναφέρεται στενή συσχέτιση αυτού του ιού, ο οποίος προκαλεί ηπατίτιδα B και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Μηχανισμός δράσης των DNA ιών.

Οι ογκογόνοι DNA ιοί μπορεί να βρίσκονται στο κύτταρο ξενιστή είτε με τη μορφή ιϊκού DNA ενσωματωμένου στο DNA του κυττάρου, είτε με τη μορφή επισωμάτων ιού που εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή αλλά δεν είναι ενσωματωμένοι στο DNA. Μπορούν να αλλοιώσουν την κυτταρική λειτουργία μέσω παραγωγής ιϊκών πρωτεϊνών που επιδρούν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Αυτό γίνεται κυρίως μέσω διέγερσης της δράσης πυρηνικών πρωτεϊνών (παραγώγων πρωτοογκογονιδίων) που ευνοούν την επιτάχυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μέσω της απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

## *RNA ιοί*

Όλοι οι ογκογόνιοι RNA ιοί είναι ρετροϊοί και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

A) Ρετροϊοί που προκαλούν ταχύ μετασχηματισμό (acute transforming retroviruses). Προκαλούν ταχεία επαγωγή όγκων σε πειραματόζωα. Περιέχουν ιϊκά ογκογονίδια (viral oncogenes) που προέρχονται από πρωτο-ογκογονίδια, τα οποία αποτελούν φυσιολογικά γονίδια όλων σχεδόν των εμβίων όντων και έχουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση. Η ενσωμάτωση των πρωτο-ογκογονιδίων στο ιϊκό γονιδίωμα προκαλεί απώλεια ιϊκών γονιδίων που είναι απαραίτητα για την αναπαραγωγή του ιού, έτσι οι acute transforming viruses είναι ελλειμματικοί ως προς την αναπαραγωγή τους.

B) Ρετροϊοί που προκαλούν βραδύ μετασχηματισμό (slow transforming retroviruses). Προκαλούν βραδεία επαγωγή όγκων σε πειραματόζωα. Δεν περιέχουν ιϊκά ογκογονίδια και έχουν δυνατότητα αναπαραγωγής.

Γ) Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει για τον ιό HTLV-I (Human T-cell Lymphotropic Virus I) ο οποίος έχει ιδιαίτερο τροπισμό για τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα και θεωρείται ότι προκαλεί μια επιθετική μορφή λεμφικής λευχαιμίας που είναι ενδημική στην Ιαπωνία και την Καραϊβική<sup>34</sup>.

### **Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια**

Ογκογονίδια: Είναι γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στη νεοπλασματική εξαλλαγή των φυσιολογικών κυττάρων.

Πρωτο-ογκογονίδια: Είναι φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια τα οποία συμμετέχουν στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Τα πρωτο-ογκογονίδια μπορούν να μετατραπούν σε ογκογονίδια μέσω μεταβολών της δομής ή/και της λειτουργίας τους. Οι μεταβολές αυτές των πρωτο-ογκογονιδίων μπορούν να επισυμβούν με την επίδραση φυσικών, χημικών ή/και βιολογικών παραγόντων.

Ταυτοποίηση της παρουσίας ογκογονιδίων σε νεοπλασίες του ανθρώπου: Η παρουσία κυτταρικών ογκογονιδίων αποδείχθηκε όταν η κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού NH/3T3 μολύνθηκε με DNA από κακοήθη κύτταρα νεοπλασίας ανθρώπου. Τα μολυσμένα ινοβλαστικά κύτταρα NH/3T3 απέκτησαν ιδιότητες κακοηθών κυττάρων, όπως, δυνατότητα πρόκλησης κακοήθους νεοπλασίας όταν εμφυτευθούν σε ανοσοκατεσταλμένο ποντίκι και απώλεια της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης λόγω επαφής των κυττάρων (loss of

contact-inhibition). Η μέθοδος της μόλυνσης κυτταρικών σειρών με DNA προερχόμενο από κακοήθεις νεοπλασίες επέτρεψε την ταυτοποίηση κυτταρικών ογκογονιδίων σε 20% των ανθρώπων νεοπλασιών<sup>36</sup>.

Λειτουργίες πρωτο-ογκογονιδίων: Για την κατανόηση της δυνατότητας εξαλλαγής των κυττάρων λόγω της δράσης των ογκογονιδίων είναι απαραίτητο να περιγραφούν οι βασικές αρχές της λειτουργίας των πρωτο-ογκογονιδίων και η δράση τους κατά τη φυσιολογική κυτταρική ζωή.

Η διέγερση του κυττάρου και η είσοδός του στον κυτταρικό κύκλο σε φάση κυτταρικού πολλαπλασιασμού προκαλείται συχνά από παράγοντες ανάπτυξης (αυξητικούς παράγοντες) οι οποίοι συνδέονται με υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη. Το σήμα που δέχονται οι υποδοχείς αυτοί από τους αυξητικούς παράγοντες μεταβιβάζεται στο κυτταρόπλασμα και κατόπιν στον πυρήνα μέσω κυτταροπλασματικών μεταβιβαστών όπως, π.χ.  $Ca^{++}$ . Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο. Τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων ταξινομούνται ανάλογα με το ρόλο τους στη διαδικασία μεταβίβασης του σήματος. Κατά συνέπεια μπορεί να είναι:

α) *Αυξητικοί παράγοντες (Growth Factors)*. Φαίνεται ότι η απορρύθμιση της λειτουργίας των αυξητικών παραγόντων είναι δευτερογενές φαινόμενο, δηλαδή δεν οφείλεται σε πρωτογενή βλάβη στο επίπεδο του DNA των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυξητικούς παράγοντες αλλά οφείλεται σε ενεργοποίηση άλλων ογκογονιδίων τα οποία επιδρούν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των αυξητικών παραγόντων.

β) *Πρωτεϊνοκινάσες (ένζυμα φωσφορυλίωσης)*. Πρόκειται για ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων σε υπόλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται σε πρωτεΐνες και εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα. Οι κινάσες της τυροσίνης που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη έχουν λειτουργία υποδοχέα για αυξητικούς παράγοντες. Σε παθολογικό επίπεδο, η αυξημένη δραστηριότητα (υπερέκφραση) των υποδοχέων συνδέεται περισσότερο με υπερέκφραση φυσιολογικών υποδοχέων παρά με υπερέκφραση παθολογικών υποδοχέων (εξαίρεση αποτελεί το γονίδιο erb-B2 και σε μερικές περιπτώσεις το γονίδιο του EGFR).

γ) *GTP-συνδέουσες πρωτεΐνες*. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκει η οικογένεια ras. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πρωτο-ογκογονίδια της οικογένειας ras

έχουν σημαντική ομολογία αμινοξέων με τις G-πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης και συμμετέχουν στη μεταβίβαση του σήματος από το εξωτερικό περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα. Όταν η πρωτεΐνη *ras-p21* κωδικοποιείται από γονίδιο *ras* με μετάλλαξη, τότε παραμένει διαρκώς σε ενεργοποιημένη κατάσταση, γεγονός που οδηγεί σε ενίσχυση του σήματος που έχει προκαλέσει την ενεργοποίησή της. Οι μεταλλάξεις του *ras* είναι οι πιο συχνά απαντώμενες ανωμαλίες ογκογονιδίων στις ανθρώπινες κακοήθεις νεοπλασίες αλλά παρατηρούνται και σε καλοήθεις νεοπλασίες, γεγονός που υπαινίσσεται πρόωμη συμμετοχή του ογκογονιδίου *ras* στην ογκογένεση.

δ) *Πυρηνικές πρωτεΐνες*. Τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων *myc*, *fos*, και *myb* είναι πυρηνικές πρωτεΐνες και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και συνδέονται με ειδικές DNA-αλληλουχίες. Οι περισσότερες θεωρούνται ως μεταγραφικοί παράγοντες που ενέχονται στο διπλασιασμό του DNA και την κυτταρική διαφοροποίηση. Η οικογένεια *c-myc* θεωρείται ότι συμμετέχει στην παθογένεση κακοηθών νεοπλασμάτων κυρίως μέσω γονιδιακής ενίσχυσης. Εν τούτοις, έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του *c-myc* και χωρίς γονιδιακή αλλοίωση και θεωρείται ότι σε αυτές τις περιπτώσεις αντανάκλα περισσότερο τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Με αυτή την έννοια, η υπερέκφραση του *c-myc* θα ήταν περισσότερο αποτέλεσμα παρά αιτία ογκογένεσης<sup>36</sup>.

Ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων: Για τη μετατροπή ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο αρκεί η ενεργοποίηση του ενός μόνο αλληλόμορφου, δηλαδή, τα ογκογονίδια συμπεριφέρονται με κυρίαρχο χαρακτήρα στο κυτταρικό επίπεδο. Τα πρωτο-ογκογονίδια μπορούν να μετατραπούν σε ογκογονίδια μέσω σημειακών μεταλλάξεων, χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων ή/και γονιδιακής ενίσχυσης. Σημειακές μεταλλάξεις ενεργοποιούν τα πρωτο-ογκογονίδια *ras*. Οι χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν πρωτο-ογκογονίδια είτε με την τοποθέτησή τους κοντά σε ισχυρούς προαγωγείς/ενισχυτές της μεταγραφής, είτε με συγχώνευση του γονιδίου και δημιουργία νέων γενετικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν χιμαιρικές πρωτεΐνες. Η γονιδιακή ενίσχυση είναι αναδιπλασιασμός του γενετικού υλικού συγκεκριμένης περιοχής, για παράδειγμα, ενίσχυση του *C-erb B* πρωτο-ογκογονιδίου παρατηρείται συχνά στο καρκίνωμα του μαστού.

Επιλεκτική ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων ανάλογα με τον ιστό και τον τύπο της νεοπλασίας (tumor and tissue specificity of oncogene activation). Το εύρος της συμμετοχής των ογκογονιδίων στις νεοπλασίες αντανακλά εν μέρει τη διαφορετική έκφραση των αντίστοιχων πρωτο-ογκογονιδίων στα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα από τα οποία προέρχεται η νεοπλασία.

Ογκοκατασταλτικά γονίδια: Μία κακοήθης νεοπλασία μπορεί να αναπτυχθεί επίσης μέσω αδρανοποίησης γονιδίων που καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτά τα γονίδια ονομάζονται ογκοκατασταλτικά γονίδια (αρχικά αντι-ογκογονίδια) και έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό και κατ' επέκταση να καταστέλλουν το σχηματισμό όγκων. Θεωρείται ότι τα μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμπεριφέρονται με υπολειπόμενο χαρακτήρα στο κυτταρικό επίπεδο. Κύτταρα στα οποία έχει αδρανοποιηθεί μόνο το ένα αλληλόμορφο δεν εκφράζουν νεοπλασματικό φαινότυπο. Όταν αδρανοποιηθεί και το δεύτερο αλληλόμορφο τότε παύει ο αρνητικός έλεγχος στο κυτταρικό επίπεδο και ευνοείται η δημιουργία νεοπλασίας. Δηλαδή, για την απώλεια της ογκοκατασταλτικής δράσης ενός γονιδίου είναι απαραίτητη η απώλεια ή απενεργοποίηση και των δύο αλληλόμορφων. Χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb gene). Επίσης το γονίδιο p53 είναι ογκοκατασταλτικό, αλλά το μεταλλαγμένο p53 συμπεριφέρεται με κυρίαρχο χαρακτήρα στο κυτταρικό επίπεδο<sup>37</sup>.

Συnergική δράση ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην παθογένεση των νεοπλασιών.

Ο υπέρμετρος πολλαπλασιασμός θα μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε ενεργοποίησης ογκογονιδίων, είτε απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων<sup>35</sup>. Σύμφωνα με τις τρέχουσες απόψεις, η ενεργοποίηση ενός μόνο ογκογονιδίου είναι επαρκής μόνο προσωρινά για την επαγωγή ανώμαλης κυτταρικής ανάπτυξης. Για την ανάδυση ενός αυτόνομου κυτταρικού κλώνου απαιτείται συμμετοχή πολλών ενεργοποιημένων ογκογονιδίων και αδρανοποιημένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως επίσης και συμμετοχή άλλων κυτταρικών κυκλωμάτων σχετικών με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, η ανάδυση ενός αυτόνομου νεοπλασματικού κλώνου σχετίζεται με διαδικασίες επιλογής ανθεκτικών

κυτταρικών κλώνων. Κλασικό παράδειγμα συνεργικής δράσης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην πολυπαραγοντική και πολυσταδιακή διαδικασία της ογκογένεσης αποτελεί το καρκίνωμα του παχέος εντέρου, για τη μοριακή βιολογία του οποίου γίνεται λόγος ειδικότερα στο επόμενο κεφάλαιο<sup>36,37</sup>.

### **Ογκογένεση και απόπτωση**

Η απόπτωση είναι ένας τύπος κυτταρικού θανάτου που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυσιολογικών ιστών. Είναι ο σπουδαιότερος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στους ανθρώπους. Ρυθμίζεται από φυσιολογικά ερεθίσματα και παρατηρείται σε πολλά είδη και ιστούς. Θεωρείται ως μία μορφή *προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου* με ειδικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά και διαφέρει από την άλλη μορφή κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται νέκρωση<sup>38</sup>.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι: συρρίκνωση του κυττάρου χωρίς διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, πύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης, εξοίδηση του ενδοπλασματικού δικτύου, κατάτμηση του πυρήνα και τελικά κατάτμηση του κυττάρου σε σωματίδια που περικλείονται από κυτταρική μεμβράση σχηματίζοντας κυστίδια και ονομάζονται αποπτωτικά σωματίδια. Η ταχεία πρόσληψη του κυττάρου από φαγοκύτταρα προλαμβάνει τη φλεγμονώδη διήθηση. Από βιοχημική άποψη, η απόπτωση είναι διαδικασία που απαιτεί κατανάλωση ενέργειας με τη διέγερση μεταβολικών οδών, μεταγραφή γονιδίων και πρωτεϊνσύνθεση. Ένας σημαντικός μηχανισμός είναι η ενεργοποίηση ενδονουκλεασών που προκαλούν κατάτμηση του DNA σε σταθερά τμήματα. Σε αντίθεση, η κλασική νέκρωση παρουσιάζει εξοίδηση του κυττάρου και τυχαία κατάτμηση του DNA<sup>38,39,40</sup>.

Η απόπτωση συνδέεται με την ενεργοποίηση γονιδιακών προγραμμάτων στα οποία συμμετέχουν επαγωγείς και καταστολείς της διαδικασίας. Επαγωγή ή καταστολή προκαλείται ως απάντηση σε εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια σήματα όπως κυτταροκίνες, ορμόνες, πρωτεΐνες ιόν, φυσικοί και χημικοί παράγοντες. Σημαντικό για την κατανόηση των διαφορών απόπτωσης/νέκρωσης είναι το γεγονός ότι η απόπτωση αποτελεί μια γονιδιακά κατευθυνόμενη διαδικασία που οδηγεί στην κυτταρική αυτοκτονία, ενώ η νέκρωση είναι ένας τυχαίος κυτταρικός θάνατος που προέρχεται από την αποτυχία των προσαρμοστικών γενετικών και

μεταβολικών απαντήσεων του κυττάρου σε βλαπτικούς παράγοντες (κυρίως ανοξία και οξειδωτικές ουσίες). Βέβαια και στη νέκρωση παρατηρούνται καθορισμένες γενετικά απαντήσεις, όπως η έκφραση heat-shock πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών προϊόντων (όπως μεταλλοθειονίνες και αιμο-οξυγενάση) που επάγεται από οξειδωτικούς παράγοντες. Όμως, στην απόπτωση οι μηχανισμοί ενεργοποίησης γονιδιακών προγραμμάτων εξαρτώνται από το κύτταρο-στόχος, ενώ στη νέκρωση οι κυτταρικοί μηχανισμοί είναι κοινοί και ανεξάρτητοι από το κύτταρο-στόχος<sup>40</sup>.

Εν τούτοις, τα σύνορα απόπτωσης/νέκρωσης δεν είναι εντελώς σαφή. Για παράδειγμα, η επαγόμενη από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) κυτταροτοξικότητα μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση ή νέκρωση. Επίσης, στο μοντέλο της ισχαιμικής νέκρωσης του ήπατος αρχικά παρατηρείται κεντρολοβιακή νέκρωση και αργότερα απόπτωση περιφερικά των λοβίων. Θα ήταν λοιπόν δυνατό να υποτεθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις κάποια διεγερτικά σήματα μπορούν να επάγουν κατ' αρχήν απαντήσεις κοινές για τους δύο τύπους κυτταρικού θανάτου αλλά η συνύπαρξη άλλων παραμέτρων όπως χρόνος, εντόπιση, ένταση διέγερσης, καθορίζουν την επέλευση νέκρωσης ή απόπτωσης<sup>38,40</sup>.

Διάφορα ερεθίσματα μπορούν να επάγουν την απόπτωση, ακόμα και στο ίδιο κύτταρο. Στα κύτταρα του θύμου αδένος η απόπτωση ενεργοποιείται από τα γλυκοκορτικοειδή, που αποτελούν φυσιολογικό ερέθισμα, αλλά και από χαμηλής δόσης ακτινοβολία ή από έκθεση σε συγκεκριμένα δηλητήρια. Όταν πρόκειται για εξωγενή βλαπτικά ερεθίσματα, για να είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί το «αποπτωτικό πρόγραμμα» πρέπει η βλάβη που προκαλούν να μην είναι ιδιαίτερα σοβαρή. Τα θυμοκύτταρα που θερμαίνονται στους 43°C πεθαίνουν με νέκρωση αν παραμείνουν σ' αυτή τη θερμοκρασία, ενώ αν επιστραφούν σύντομα στους 37°C, πεθαίνουν με απόπτωση. Τελεολογικά, έχει υποτεθεί ότι μπορεί να είναι αρκετά επικίνδυνο για τα λεμφοκύτταρα να προσπαθήσουν να επιδιορθώσουν συγκεκριμένες βλάβες, καθώς η ελλατωματική επιδιόρθωση θα οδηγούσε δυνητικά σε λευχαιμία ή ενεργοποίηση των αυτοάνοσων μηχανισμών. Αντ' αυτού, ενεργοποιούν τον αποπτωτικό μηχανισμό, διαπράττοντας κατά κάποιον τρόπο ένα είδος “αλτρουϊστικής αυτοκτονίας”. Η αυτοκτονία των σωματικών κυττάρων εξασφαλίζει την επιβίωση των γαμετών, ένα κεντρικό σενάριο στη βιολογία, που



ανευρίσκεται και σε εντελώς διαφορετικά συστήματα, όπως η κοινωνία των μελισσών<sup>40</sup>.

Η μελέτη της απόπτωσης οδηγεί και σε μια άλλη κρίσιμη ερώτηση. Πότε αρχίζει και πότε τελειώνει; Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση από το μοντέλο των επιθηλιακών κυττάρων δείχνει ότι μετά την απόπτωση συμβαίνουν επιπλέον εκφυλιστικές αλλοιώσεις, οι οποίες έχουν χαρακτηριστικά νέκρωσης. Άρα, είναι πιθανό σε μερικές περιπτώσεις η απόπτωση να μην αποτελεί την «τελική λύση» στην υπόθεση της φυσιολογικής ανανέωσης των κυττάρων αυτών. Από την άλλη πλευρά, δεν υπάρχουν ασφαλείς δείκτες για την επισήμανση της έναρξης της απόπτωσης. Στο μοντέλο της επαγόμενης από τα γλυκοκορτικοειδή απόπτωσης των θυμοκυττάρων ως πρώιμες ενδείξεις απόπτωσης θεωρούνται η μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης και η σύνθεση RNA και πρωτεϊνών<sup>38</sup>.

Στη ρύθμιση της απόπτωσης συμμετέχουν ορισμένα ογκογονίδια, όπως το bcl-2 και το myc, καθώς και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Το bcl-2 θεωρείται ότι αναστέλλει την απόπτωση και επηρεάζεται αρνητικά από την έκφραση του p53. Το ογκογονίδιο c-myc ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης και κατά συνέπεια μπορεί να επηρεάζει την κακοήθη εξαλλαγή μέσω μιας από τις δύο ανταγωνιστικές αυτές οδούς. Η δράση του εξαρτάται από την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, μη-ενεργοποίηση του c-myc απουσία αυξητικών παραγόντων οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού, ενεργοποίησή του παρουσία αυξητικών παραγόντων προάγει τον πολλαπλασιασμό και ενεργοποίησή του απουσία αυξητικών παραγόντων οδηγεί σε απόπτωση, με ενδιάμεσα στάδια μεταξύ αυτών των διαδικασιών.

Επίσης σημαντικό ρόλο στην απόπτωση παίζει ο μεμβρανικός υποδοχέας APO-1/fas(CD95), ο οποίος ανήκει στην ίδια κατηγορία με τους υποδοχείς για νευρωνικούς αυξητικούς παράγοντες (NGFR) και τους υποδοχείς για τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFR). Ο υποδοχέας APO-1/fas επάγει την απόπτωση σε λεμφικά κύτταρα όταν αυτά βρεθούν σε περιβάλλον με ειδικά αντισώματα εναντίον των ανοσοσφαιρινών. Άλλα μόρια που μπορούν να επάγουν απόπτωση είναι λιπόφιλα μόρια (γλυκοκορτικοειδή, ρετινοειδή), τα οποία αντιδρούν με πυρηνικούς υποδοχείς και επάγουν τη μεταγραφή αποπτωτικών γονιδίων<sup>38</sup>.

Σημαντική για την απόπτωση είναι και η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα “φυσικοί φονείς” (Natural Killers-NK) μπορούν να καταστρέφουν νεοπλασματικά κύτταρα προκαλώντας απόπτωση. Εκτός από το ανοσοποιητικό σύστημα, απόπτωση στα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα επάγουν φυσικοί παράγοντες (γ-ακτινοβολία, υπεριώδης ακτινοβολία) και χημικοί-φαρμακευτικοί παράγοντες (σισπλατίνη, ετοποσίδη, αλκυλιωτικοί παράγοντες)<sup>38</sup>.

Αν ανακεφαλαιώσουμε τη σχέση απόπτωσης/ογκογένεσης θα πρέπει να την τοποθετήσουμε στο επίπεδο της απορρύθμισης των φυσιολογικών λειτουργιών των επαγωγέων (c-myc, wild type p53, bax) και αναστολέων της απόπτωσης (bcl-2, bcl<sub>x</sub>). Επειδή όμως τα c-myc και wt-p53 εκτός από επαγωγείς απόπτωσης είναι και επαγωγείς κυτταρικού πολλαπλασιασμού (το πρώτο) και ογκοκατασταλτικό γονίδιο (το δεύτερο), η σχέση απόπτωσης/ογκογένεσης συνδέεται άμεσα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τις λειτουργίες καταστολής του κακοήθους φαινότυπου.

Ένας από τους λόγους που το κύτταρο επιλέγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο είναι η παρουσία βλαβών του γενετικού του υλικού σε μια προσπάθεια να διακόψει τη διαιώνισή τους. Όταν η απόπτωση αποτυγχάνει να φτάσει ως διαδικασία στην ολοκλήρωσή της οι βλάβες αυτές παραμένουν και πιθανόν να αναπαράγονται στους απογόνους αν το κύτταρο διατηρεί την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται. Επίσης, όταν ο μηχανισμός της απόπτωσης αναστέλλεται από κάποιους παράγοντες οδηγεί σε επιμήκυνση της επιβίωσης των κυττάρων με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη επιδεκτικότητα σε επιπρόσθετες αλλοιώσεις πρωτο-ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Έτσι, η αναστολή της απόπτωσης συμμετέχει στην ογκογένεση επιτρέποντας την επιβίωση κτάρων με γονιδιακές αλλοιώσεις και αυξάνοντας την πιθανότητα συσσώρευσης νέων γονιδιακών αλλοιώσεων<sup>39,40</sup>.

### **Κυτταρικός κύκλος και ογκογένεση**

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο που κατέχουν στην ογκογένεση ορισμένες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο και είναι οι κυκλίνες (cyclines) και οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases/CDKs). Πολλές ενδείξεις προέρχονται από τις κυκλίνες D. Αυτές δρουν

στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου όπου τα κύτταρα αποφασίζουν αν θα αναδιπλασιάσουν το DNA τους για να προχωρήσουν στη μίτωση. Οι D κυκλίνες δρουν ως αισθητήρια όργανα των αυξητικών παραγόντων και μαζί μ' αυτούς βοηθούν το κύτταρο να προχωρήσει στον αναδιπλασιασμό του DNA. Μόλις το κύτταρο εισέλθει σε αυτή τη φάση δεν έχει πλέον ανάγκη τους αυξητικούς παράγοντες, ενώ οι κυκλίνες συνεχίζουν να επιδρούν, γεγονός που συνεχίζεται και κατά τη μίτωση. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των νεοπλασματικών κυττάρων είναι η κυτταρική διαίρεση χωρίς διέγερση από εξωτερικούς παράγοντες. Άρα είναι λογικό να υποτεθεί ότι η υπερδιέγερση κυκλινών D, προκαλώντας ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση χωρίς ανάγκη από αυξητικούς παράγοντες, θα έχει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση. Παράδειγμα η διαμετάθεση 11:14 σε B-λεμφώματα του μανδύα του βλαστικού κέντρου των δευτερογενών λεμφοζιδίων ενεργοποιεί την κυκλίνη D1, η οποία θεωρείται πλέον ταυτόσημη με το ογκογονίδιο bcl-1.

Στον κυτταρικό κύκλο όμως συμμετέχουν και οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors). Ένας γενικός αναστολέας των CDKs είναι το παράγωγο του WAF1/CIP1 γονιδίου, η πρωτεΐνη p21<sup>WAF1/CIP1</sup>.<sup>41</sup> Η p21<sup>WAF1</sup> είναι ισχυρός και συγχρόνως αναστρέψιμος αναστολέας της προόδου του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2 και ενεργοποιείται ως ανταπόκριση σε βλάβη του DNA. Μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2 οδηγεί σε απόπτωση<sup>41</sup>. Η υπερέκφραση, λοιπόν, του γονιδίου WAF1 καταστέλλει την ανάπτυξη, γεγονός που συμφωνεί με τη λειτουργία του πρωτεϊνικού παραγώγου του p21<sup>WAF1</sup> ως αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Αποτελεί επίσης ένα από τα γονίδια-στόχους του p53 προκειμένου αυτό να ασκήσει τη δράση του στην καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης.

Βλέπουμε ότι η σχέση μεταξύ ογκογένεσης, απόπτωσης και κυτταρικού κύκλου διαπλέκεται ακόμα περισσότερο. Έλλειψη της p21<sup>WAF1</sup> προκαλεί αδυναμία αναστολής του κυτταρικού κύκλου όταν υπάρχουν βλάβες στο DNA βοηθώντας στην ογκογένεση, ενώ όταν η p21<sup>WAF1</sup> λειτουργεί σωστά προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου που θα οδηγήσει στην έναρξη της απόπτωσης αποτρέποντας την πιθανότητα ογκογένεσης<sup>41</sup>. Επιπλέον, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53

συμμετέχει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του WAF1.

### **Απλοποιημένο σχήμα παθογένεσης των νεοπλασμάτων**

Με βάση τα δεδομένα που αναπτύχθηκαν, η διαδικασία της νεοπλασματικής εξελλαγής θεωρείται ότι αφορά σε ένα πολυσταδιακό, πολυδύναμο μοντέλο μοριακών μετασχηματισμών που περιλαμβάνει:

— Μεταλλάξεις του DNA των φυσιολογικών κυττάρων από φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες.

— Ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Τα ενεργοποιημένα πρωτο-ογκογονίδια δρουν ως ογκογονίδια και προάγουν την αυτόνομη κυτταρική ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυτταρικών πληθυσμών μέσω:

α) κωδικοποίησης για αυξητικούς παράγοντες,

β) κωδικοποίησης για υποδοχείς αυξητικών παραγόντων οι οποίοι είναι είτε ελλειμματικοί στη δομή τους, είτε ενισχυμένοι,

γ) κωδικοποίησης για μεμβρανικές ή/και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σημαντικές για τη μεταβίβαση σημάτων στο εσωτερικό των κυττάρων και

δ) κωδικοποίησης για πρωτεΐνες ρυθμιστές της απόπτωσης.

Η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων αίρει τον αρνητικό έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και προάγει με αυτόν τον τρόπο την επέκταση κλώνων που υπό άλλες συνθήκες μπορεί να μην επιβίωναν.

Η αναστολή των προγραμμάτων απόπτωσης είναι επίσης σημαντική στην απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Εκτός από αυτούς τους παράγοντες, σημαντικό ρόλο επίσης διαδραματίζει το ανοσολογικό σύστημα και άλλοι αμυντικοί μηχανισμοί του ανθρώπινου σώματος στην αντιμετώπιση των νεοπλασματικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε ελλειμματική λειτουργία αυτών των συστημάτων ευνοεί την επέκταση των νεοπλασματικών κυτταρικών πληθυσμών<sup>35,36</sup>.

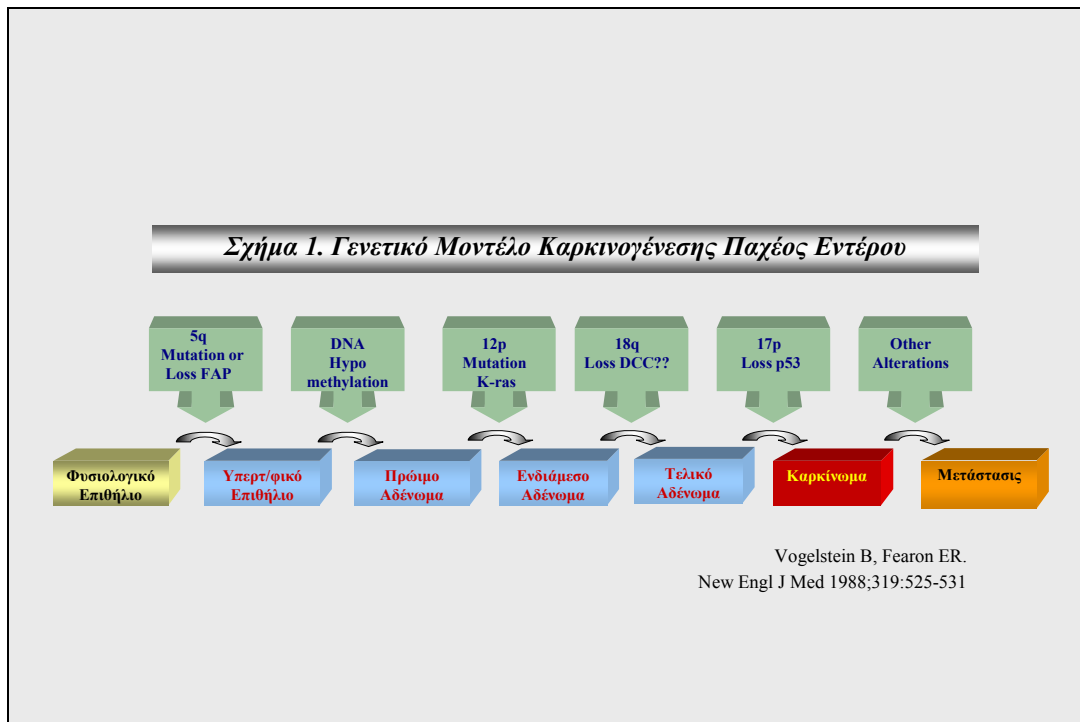
## ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε νεοπλασματικό πρέπει να διαφύγει τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (της απόπτωσης). Τα σήματα με τα οποία επιτυγχάνεται ο έλεγχος μπορεί να προέρχονται είτε από το ίδιο το κύτταρο, είτε από τα γειτονικά επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα. Η νεοπλασματική εξαλλαγή είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία που απαιτεί την άθροιση γενετικών αλλαγών (μεταλλάξεων) και το συνδυασμό ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων και αδρανοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων<sup>33</sup>. Το σύνολο και η σειρά των μεταλλάξεων που απαιτούνται για τη γονιδιακή "δυσλειτουργία" που θα οδηγήσει στη νεοπλασματική εξαλλαγή ονομάζεται *γενετική οδός* της καρκινογένεσης.

### **Μοντέλο ανάπτυξης σποραδικών καρκινωμάτων**

Στην προσπάθεια να κατανοήσουν τους μοριακούς μηχανισμούς που ενέχονται στη γενετική οδό του καρκινώματος του παχέος εντέρου στον άνθρωπο, οι ερευνητές προσπάθησαν να αναγνωρίσουν τις γενετικές αλλοιώσεις που υπάρχουν στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης των όγκων αυτών. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη του μοντέλου των Fearon και Vogelstein (σχήμα 1) που σχετίζεται με την ακολουθία αδενώματος-καρκινώματος<sup>42</sup>. Στο μοντέλο αυτό, προτείνεται μία καθορισμένη σειρά μεταλλάξεων που αφορούν συνδυασμό απώλειας ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων που πιθανόν αποτελούν τη γενετική οδό της καρκινογένεσης. Σημειώνεται όμως, ότι τον κυριότερο παράγοντα για τη νεοπλασματική εκτροπή αποτελεί η συσσώρευση των μεταλλάξεων. Δηλαδή, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μεταλλάξεων, τόσο προχωρούμε προς τα δεξιά στην ακολουθία φυσιολογικού βλεννογόνου-αδενώματος-καρκινώματος.

Απώλεια του γονιδίου APC (adenomatous polyposis coli). Η πρώτη μετάλλαξη, σύμφωνα με το μοντέλο Fearon και Vogelstein επισυμβαίνει στο



ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q21 και μεταλλάξεις αυτού σε γεννητικά κύτταρα (germ line mutations) παρατηρούνται στο σύνδρομο της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης. Το πρωτεϊνικό παράγωγο του APC πιθανότατα ασκεί τη δράση του μέσω ενδοκυτταρίων μηνυμάτων ελέγχου του κυτταροσκελετού. Σύμφωνα με το μοντέλο, η απώλειά του οδηγεί σε υπέρμετρο πολλαπλασιασμό του φυσιολογικού επιθηλίου.

Υπομεθυλίωση του DNA. Το επόμενο βήμα είναι η γενικευμένη υπομεθυλίωση του DNA. Η απώλεια της μεθυλίωσης της κυτοσίνης στο DNA αναστέλλει τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και μπορεί να οδηγήσει σε μη αποσύνδεση κατά τη μίτωση με αποτέλεσμα την απώλεια ή την ανάκτηση χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση. Η υπομεθυλίωση παρατηρείται σε μεγάλο ποσοστό των αδενωμάτων, ενώ λείπει στο φυσιολογικό βλεννογόνο και γι' αυτό, στο μοντέλο, οδηγεί στην αρχή του σχηματισμού του αδενώματος. Υπομεθυλίωση στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου προκαλείται και από την επίδραση καρκινογενετικών παραγόντων οι οποίοι πιθανόν με αυτό τον τρόπο εξασκούν τη καρκινογενετική τους δράση.

Μεταλλάξεις k-ras γονιδίου. Μεταλλάξεις του k-ras γονιδίου παρατηρούνται στο 50% των σποραδικών καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Η οικογένεια των

ras γονιδίων συμμετέχει στη μεταφορά μηνυμάτων και οι σημειακές μεταλλάξεις του k-ras οδηγούν σε υπερέκφραση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Παρατηρήσεις στο φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου, σε εστίες διαταραχής των κρυπτών (aberrant crypts)<sup>43</sup> και σε μεταπλαστικούς πολύποδες ενισχύουν την άποψη ότι οι μεταλλάξεις του k-ras έχουν ιδιαίτερη σημασία μόνο όταν σχετίζονται με μετάλλαξη του APC<sup>42</sup>. Η συνύπαρξη της μετάλλαξης του k-ras στα κύτταρα με APC μετάλλαξη προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των κυττάρων εκείνων με παρουσία μόνο APC μετάλλαξης. Αποτέλεσμα της άθροισης των δύο μεταλλάξεων είναι η επικράτηση ενός νέου κλώνου κυττάρων που ιστολογικά χαρακτηρίζεται από την αναγνώριση εστιών μέτριας επιθηλιακής δυσπλασίας σε ένα αδένωμα με καθ' υπεροχή ήπια επιθηλιακή δυσπλασία. *Δηλαδή, έχουμε τη μετάβαση από το πρώιμο αδένωμα στο ενδιάμεσο αδένωμα (intermediate adenoma).*

Απώλεια του γονιδίου DCC (deleted in colorectal cancer). Η απώλεια του γονιδίου DCC αποτελεί το επόμενο βήμα στο μοντέλο των Fearon και Vogelstein που οδηγεί από το ενδιάμεσο αδένωμα στο προχωρημένο αδένωμα (late adenoma). Το παραπάνω γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q22 και κωδικοποιεί ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που παίζει σημαντικό ρόλο στη λήψη εξωκυτταρίων μηνυμάτων για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης. Η απώλειά του οδηγεί σε μειωμένη προσκόλληση των κυττάρων και μείωση της έντασης του σήματος για διατήρηση της φυσιολογικής καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα την περαιτέρω κλωνική επέκταση.

Μετάλλαξη του γονιδίου p53. Οι μεταλλάξεις του p53 αποτελούν τις συχνότερα συναντώμενες μεταλλάξεις στα κακοήθη νεοπλάσματα και απαντώνται σε ποσοστό ως 70% των σποραδικών καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Στο μοντέλο των Fearon και Vogelstein οι μεταλλάξεις του p53 επισυμβαίνουν πριν από την εγκατάσταση της διθητικής ικανότητας, κατά τη μετάβαση του προχωρημένου αδενώματος στο καρκίνωμα. Η λειτουργία του φυσιολογικού P53 (wild-type p53), που θα περιγραφεί λεπτομερώς στο επόμενο κεφάλαιο, του προσδίδει ιδιότητες ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Όταν μεταλλαχθεί το ένα αλληλόμορφο συμπεριφέρεται με επικρατούντα αρνητικό χαρακτήρα οδηγώντας το κύτταρο σε εξαλλαγή έστω και παρουσία του φυσιολογικού αλληλόμορφου,

φαινόμενο που ερμηνεύεται μερικώς από την αδρανοποίηση της φυσιολογικής p53 πρωτεΐνης από τη μεταλλαγμένη<sup>44</sup>.

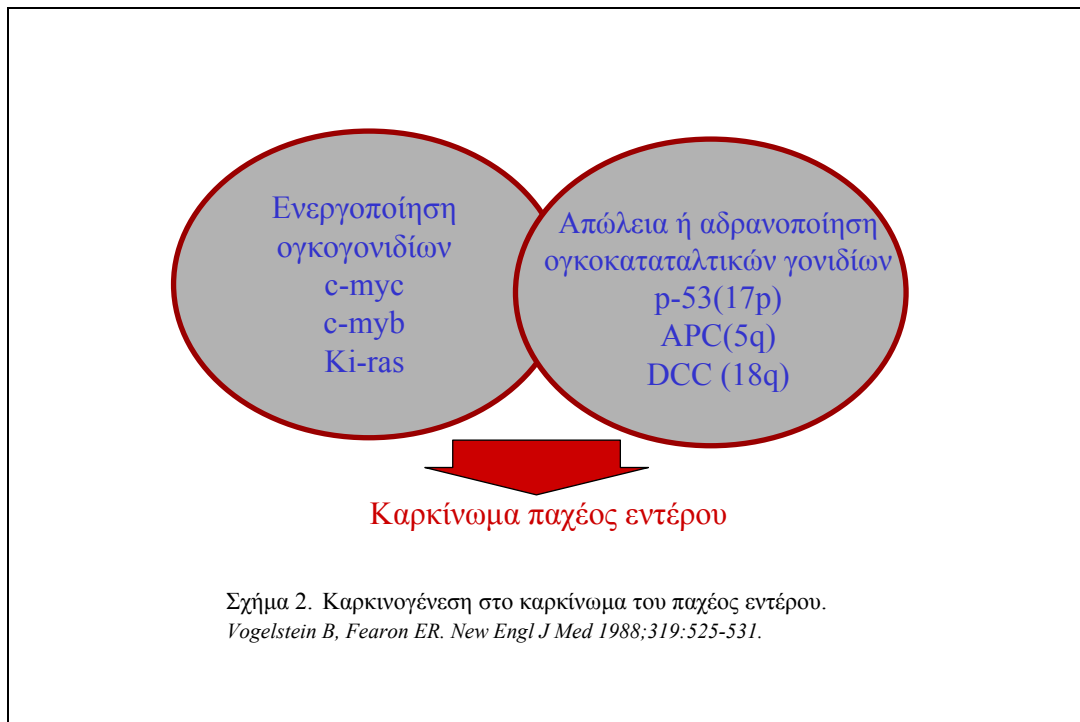
Με την απώλεια της δράσης του p53 χάνεται ο φυσιολογικός μηχανισμός διακοπής του κυτταρικού κύκλου παρουσία βλαβών του DNA (λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων). Συνεπώς τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν παρουσία βλαβών που υπό άλλες συνθήκες θα οδηγούσαν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης του νέου κλώνου των νεοπλασματικών κυττάρων, σηματοδοτώντας την εγκατάσταση του κακοήθους φαινοτύπου.

Μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη γενετική οδό της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Μεταξύ των γενετικών μεταβολών που έχουν περιγραφεί σημαντική θέση κατέχει η απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) στο χρωμόσωμα 8p, που απαντάται στο 50% των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Απώλειες αλληλίων έχουν επίσης παρατηρηθεί σε περιοχές των χρωμοσωμάτων 1p, 7p, 14p, και 22p. Στις παραπάνω περιοχές είναι δυνατό να εδράζονται ογκοκατασταλτικά γονίδια που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί αλλά φαίνεται ότι συμμετέχουν στη νεοπλασματική εκτροπή, είτε σαν υποκατάστατα των γονιδίων του μοντέλου, είτε προσδίδοντας στα νεοπλασματικά κύτταρα επιπλέον πλεονέκτημα επιβίωσης. Επιπλέον, η γονιδιακή δυσλειτουργία δεν οφείλεται μόνο σε μεταλλάξεις των αναφερόμενων γονιδίων αλλά και σε μεταλλάξεις που ρυθμίζουν τη λειτουργία τους.

Περίληπτικά στο μοντέλο της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου που προτάθηκε από τους Fearon και Vogelstein 1) απαιτείται ενεργοποίηση του k-ras και αδρανοποίηση των APC, DCC και p53 ογκοκατασταλτικών γονιδίων 2) πιθανώς ενέχονται και άλλες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και απώλειες ετεροζυγωτίας 3) σημασία έχει η ολική συσσώρευση αυτών των μεταλλάξεων και όχι η σειρά με την οποία επισυμβαίνουν, διότι ξεχωριστά η κάθε μία είναι δυνατό να υπάρχει ακόμα και σε πρώιμα στάδια της νεοπλασίας, όμως, περισσότερες από τρεις συνήθως συνυπάρχουν στα καρκινώματα (Σχήμα 2).

*Ισχύει σήμερα το μοντέλο των Fearon και Vogelstein;* Στην παθογένεση του καρκινώματος του παχέος εντέρου συμμετέχουν επίσης δύο ογκογονίδια, το c-myc και το bcl-2. Το c-myc όταν ενεργοποιείται (μέσω υπερέκφρασης χωρίς γονιδιακή





ενίσχυση) προκαλεί παράλληλη αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης, δράση που δεν προκαλεί μεταβολή του συνολικού αριθμού του κυτταρικού πληθυσμού. Το γονίδιο bcl-2 ανήκει στους ρυθμιστές της απόπτωσης και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q. Το πρωτεϊνικό του παράγωγο έχει κυτταροπλασματική εντόπιση και αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από διάφορα αίτια, συμπεριλαμβανομένου και του c-myc, χωρίς να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Υπερέκφραση (χωρίς μετάλλαξη) του bcl-2 έχει παρατηρηθεί σε μεγάλο ποσοστό αδενωμάτων, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι συμμετέχει σε πρώιμο στάδιο της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο. Είναι λοιπόν πιθανό ότι το c-myc και το bcl-2 δρουν συνεργικά με αποτέλεσμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός να επικρατεί έναντι της κυτταρικής απόπτωσης. Με το μηχανισμό αυτό, δύο μη-μεταλλαγμένα γονίδια συμμετέχουν στη νεοπλασματική εξαλλαγή, λόγω της δραστηριότητας των επαγωγέων και καταστολέων αυτών των γονιδίων<sup>40</sup>.

Συμπερασματικά, η διαδικασία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο είναι μια πιο περίπλοκη διεργασία από την προτεινόμενη στο μοντέλο των Fearon και Vogelstein. Παρ' όλα αυτά, αν και έχει περιγραφεί πριν από 8 χρόνια, διατηρεί μέχρι σήμερα τη σημασία του για την καρκινογένεση στο παχύ έντερο με την

έννοια ότι οι μεταλλάξεις των γονιδίων APC και p53 παραμένουν οι βασικές γενετικές διαταραχές στην παθογένεση του σποραδικού καρκινώματος Σχήμα 2).

### **Διαφορετικές γενετικές οδοί για την καρκινογένεση στο παχύ έντερο.**

Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι δεν αναπτύσσονται όλα τα καρκινώματα του παχέος εντέρου μέσω της ίδιας γενετικής οδού. Άλλες γενετικές οδοί προτείνονται για τα κληρονομικά μη σχετιζόμενα με πολυποδίαση καρκινώματα (HNPCC) και για τα καρκινώματα που αναπτύσσονται επί εδάφους ελκώδους κολίτιδας.

#### *A) Καρκινώματα με μεταλλάξεις στα MMR γονίδια (mismatch repair genes).*

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου HNPCC έχουν περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Ως προς το μοριακό επίπεδο, τα καρκινώματα στο σύνδρομο HNPCC είναι συνήθως διπλοειδικά με μικρή συχνότητα απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) σε αντίθεση με τα σποραδικά καρκινώματα που είναι συνήθως ανευλοειδικά με μεγάλη συχνότητα LOH. Η προδιάθεση για την ανάπτυξη καρκινωμάτων οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη (germ line mutation) οποιουδήποτε από τα λεγόμενα mismatch repair genes (γονίδια επιδιόρθωσης της αταίριαστης σύνδεσης βάσεων κατά την αντιγραφή του DNA) που είναι τα MSH2, PMS1, MLH1, PMS2 και βρίσκονται στα χρωμοσώματα 2p (τα δύο πρώτα), 3p και 7, αντίστοιχα. Σε 80-90% των περιπτώσεων τα μεταλλαγμένα γονίδια είναι τα MSH2 και MLH1<sup>19</sup>. Τα γονίδια αυτά επιδιορθώνουν λάθη της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του DNA που αφορούν στη σύνδεση αταίριαστων βάσεων. Εάν ο μηχανισμός επιδιόρθωσης δεν λειτουργεί σωστά, τότε τα λάθη της πολυμεράσης κατά το διπλασιασμό του γονιδιώματος (replication errors-RER) δεν διορθώνονται και κληρονομούνται στα θυγατρικά κύτταρα, δηλαδή προκαλείται γενετική αστάθεια.

Ένας ελαττωματικός μηχανισμός επιδιόρθωσης οδηγεί σε «λάθη» (RER) σε όλο το γονιδίωμα του κυττάρου, όμως τα λάθη αυτά είναι συχνότερα και πιο εύκολα αντιληπτά σε περιοχές του που ονομάζονται «μικροδορυφόροι» (microsatellite DNA). Οι περιοχές αυτές αποτελούνται από επαναλαμβανόμενη ακολουθία νουκλεοτιδίων που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη και βρίσκονται σε περιοχές μεταξύ γονιδίων ή στα ιντρόνια (introns) της γονιδιακής περιοχής που είναι τα τμήματα

που δε μεταφράζονται, σε αντίθεση με τα εξόνια (exons). Οι μικροδορυφόροι αποτελούν το δακτυλικό αποτύπωμα του DNA κάθε ατόμου, διότι είναι χαρακτηριστικοί για κάθε άτομο και εύκολα ανιχνεύσιμοι (π.χ. χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο πατρότητας) και είναι *σταθεροί* σε όλο το μήκος του γονιδιώματος. Λόγω της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας νουκλεοτιδίων παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία για λάθη της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή. Το αποτέλεσμα είναι η είσοδος επιπλέον ακολουθίας ή η διαγραφή ακολουθίας στα σημεία των λαθών και η διαταραχή της σταθερότητας του μήκους των μικροδορυφόρων που ονομάζεται «μικροδορυφορική αστάθεια». Συνεπώς, η μικροδορυφορική αστάθεια είναι το «σύμπτωμα» που δηλώνει λάθη στην αντιγραφή του DNA (RER-replication errors), δηλαδή, μετάλλαξη των MMR γονιδίων (mismatch repair genes)<sup>45</sup>.

Από βιολογική άποψη, ο ελαττωματικός μηχανισμός επιδιόρθωσης δεν προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης στα κύτταρα, οδηγεί όμως σε αύξηση της συχνότητας των μεταλλάξεων, δηλαδή αύξηση της πιθανότητας επικράτησης μεταλλαγμένου κλώνου κυττάρων και μ' αυτό τον τρόπο συμμετέχει στην εγκατάσταση «μεταλλαξιογόνου φαινότυπου»<sup>46</sup>. Πιθανόν δηλαδή να αποτελεί μηχανισμό επιτάχυνσης της διαδικασίας της καρκινογένεσης αλλά μπορεί να εντάσσεται σε διαφορετική καρκινογενετική οδό.

Στο σύνδρομο HNPCC παρατηρείται μετάλλαξη σε επίπεδο γεννητικού κυττάρου (γαμέτου) στο ένα αλληλίο κάποιου MMR γονιδίου (συνήθως στο MSH2 ή στο MLH1). Η μετάλλαξη του άλλου αλληλίου που γίνεται επιγενώς στα σωματικά κύτταρα του ατόμου είναι απαραίτητη για να εγκατασταθεί RER-θετικός (RER+) φαινότυπος, δηλαδή, συμπεριφέρονται με υπολειπόμενο χαρακτήρα στο κυτταρικό επίπεδο.

Τα σποραδικά καρκινώματα είναι δυνατό να είναι RER+ λόγω μετάλλαξης και των δύο αλληλίων στα κύτταρα του όγκου (μη κληρονομούμενη). Όμως, μετάλλαξη του MSH2 γονιδίου στα γεννητικά κύτταρα (κληρονομούμενη) παρατηρείται στο 2% των ατόμων με πρόιμη εμφάνιση σποραδικών καρκινωμάτων (early onset colorectal cancers)<sup>47</sup>.

Τα RER+ σποραδικά καρκινώματα έχουν τα ίδια κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά με τα καρκινώματα επί HNPCC (εντόπιση στο δεξιό κόλον, διπλοειδικά) και διαφέρουν από τα RER-αρνητικά (RER-) σποραδικά

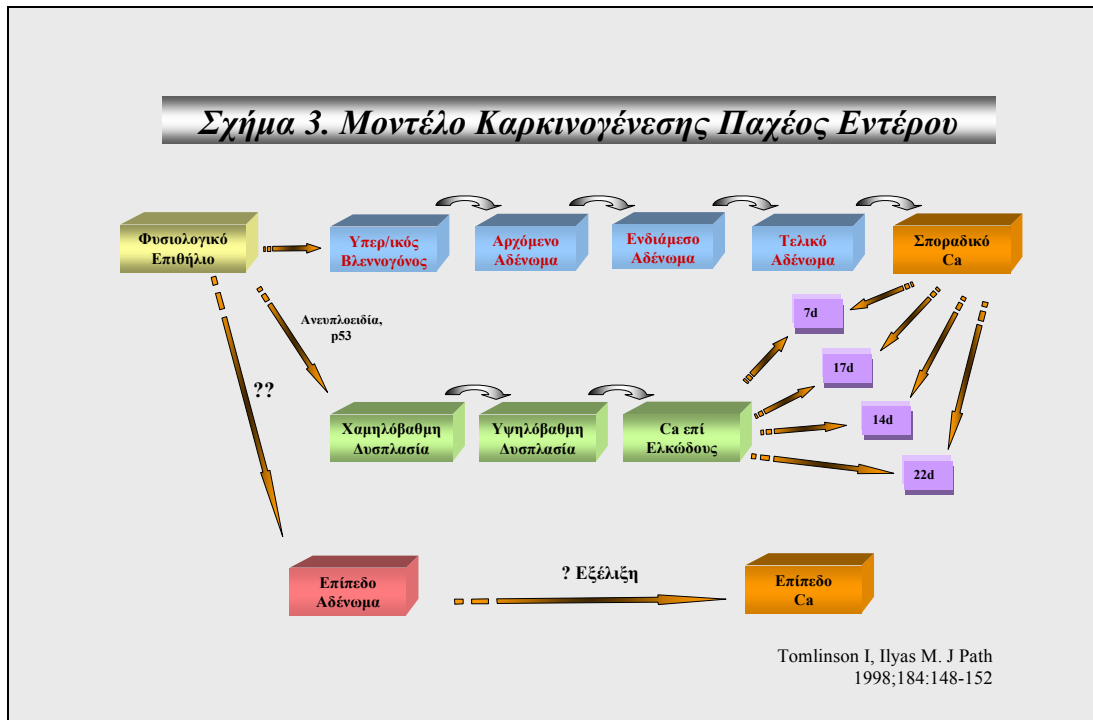
καρκινώματα. Πιθανόν, οι μεταλλάξεις των MMR γονιδίων μπορεί να συμμετέχουν στο προφίλ μεταλλάξεων μερικών καρκινωμάτων, ενώ μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) μπορεί να αποτελούν το σημαντικό συμβάν σε άλλα καρκινώματα. Πράγματι, η μελέτη από τους Kim et al<sup>48</sup> αποδεικνύει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του p53 και RER-φαινότυπου. Αργότερα, η μελέτη των Ilyas et al<sup>49</sup> δείχνει ότι τα σποραδικά RER+ καρκινώματα του δεξιού κόλου εμφανίζουν μεταλλάξεις στο p53 σε μικρότερο ποσοστό από τα σποραδικά RER- καρκινώματα του δεξιού κόλου, η διαφορά αυτή όμως δεν παρατηρείται και στα σποραδικά καρκινώματα του αριστερού κόλου. Υπάρχουν ενδείξεις δηλαδή για διαφορετικές γενετικές οδούς που όμως είναι σύνθετες και αλληλοεπικαλύπτονται<sup>50</sup>.

#### *B) Καρκινώματα παχέος εντέρου σε έδαφος ελκώδους κολίτιδας*

Ασθενείς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνωμα παχέος εντέρου που σχετίζεται με α) την ηλικία έναρξης, β) τη διάρκεια και γ) την έκταση, όχι όμως και με την ενεργότητα της νόσου. Τα καρκινώματα που αναπτύσσονται επί εδάφους ελκώδους κολίτιδας (UCACRCs-ulcerative colitis-associated colorectal cancers) εμφανίζουν διαφορετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά από τα σποραδικά καρκινώματα. Η επιθηλιακή δυσπλασία στην ελκώδη κολίτιδα είναι διάχυτη και αναπτύσσεται σε επίπεδο και όχι σε πολυποειδή βλεννογόνο όπως επί αδενωμάτων. Πολλές φορές τα καρκινώματα αναπτύσσονται χωρίς να προϋπάρχουν δυσπλαστικές επιθηλιακές αλλοιώσεις. Επίσης, φαίνεται ότι αποκτούν διηθητική ικανότητα πρώιμα, χωρίς απαραίτητα να αναπτύσσονται ως ενδοαυλική μάζα (Σχήμα 3)<sup>51</sup>.

Οι διαφορές στην καρκινογένεση των UCACRCs ενισχύονται από μελέτες που αφορούν την αλληλεπίδραση αδενικού επιθηλίου και περικρυπτικών ινοβλαστών. Στα σποραδικά καρκινώματα οι περικρυπτικοί ινοβλάστες εμφανίζουν στενή σχέση με το αδενικό επιθήλιο στα αρχικά στάδια της νεοπλασματικής εκτροπής ενώ στα προχωρημένα στάδια και όταν το νεόπλασμα γίνεται διηθητικό, οι

περικρυπτικοί ινοβλάστες διασκορπίζονται. Στην επιθηλιακή δυσπλασία επί ελκώδους κολίτιδας η σχέση αδενικού επιθηλίου-περικρυπτικών ινοβλαστών διαταράσσεται πρώιμα και αντικατοπτρίζει μεταβολή στη φύση του αδενικού επιθηλίου. Πιθανότατα παίζει ρόλο στην καρκινογένεση λόγω παραγωγής ανασταλτικών ουσιών για το σχηματισμό δομικών στοιχείων των βασικών μεμβρανών<sup>51</sup>.



Επιπλέον υπάρχουν γενετικές παρατηρήσεις που ενισχύουν την άποψη ύπαρξης διαφορετικής γενετικής οδού. Πρώτον, η συχνότητα μεταλλάξεων του APC γονιδίου είναι μικρότερη σε UCACRCs (30%) συγκριτικά με το 60-80% των σποραδικών καρκινωμάτων. Δεύτερον, οι μεταλλάξεις του k-ras γονιδίου απαντώνται σπανιότερα σε UCACRCs ενώ είναι συχνότερη η απώλεια ετεροζυγωτίας. Τρίτον, η ανευπλοειδία παρατηρείται πρωϊμότερα κατά τη νεοπλασματική εκτροπή επί ελκώδους κολίτιδας ενώ η υπερέκφραση του bcl-2 γονιδίου είναι λιγότερο συχνή. Τέταρτον, οι μεταλλάξεις του p53 επισυμβαίνουν σε πρωϊμότερα στάδια της νεοπλασματικής εκτροπής<sup>51</sup>.

Μπορεί να υπάρχουν συγκεκριμένες διαφορές στο φάσμα των μεταλλάξεων μεταξύ RER+, RER- και UCA καρκινωμάτων. Υπάρχει όμως σε μεγάλο βαθμό

αλληλοεπικάλυψη των γενετικών οδών κατά την καρκινογένεση του παχέος εντέρου<sup>51</sup>.

## Η ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μέθοδο ανίχνευσης διαφόρων αντιγόνων σε κύτταρα και ιστούς με τη χρήση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων. Ραγδαία πρόοδος έχει παρατηρηθεί στον τομέα της ανοσοανίχνευσης από την εποχή που οι Coops και συν.<sup>52</sup> χρησιμοποίησαν σεσημασμένο με φλουορεσκεΐνη αντίσωμα για την ανάδειξη στρεπτοκοκκικών αντιγόνων. Έκτοτε διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί όπως ο άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός, η άμεσος και έμμεσος μέθοδος της ανοσοϋπεροξειδάσης, η μέθοδος ανοσοϋπεροξειδάσης-αντιϋπεροξειδάσης (PAP), η μέθοδος της ενζυματικής γέφυρας και του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης (ABC), η μέθοδος της αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP).

Οι μέθοδοι της ανοσοϋπεροξειδάσης-αντιϋπεροξειδάσης (PAP) και της αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP) είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες σήμερα. Η δυνατότητα εφαρμογής τους σε τομές παραφίνης ιστών μονιμοποιημένων σε φορμόλη τις καθιστά εύχρηστες στην καθ' ημέρα διαγνωστική πράξη και πολύτιμες στην αναδρομική μελέτη νεοπλασματικών ιστών<sup>53</sup>.

Η εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας σε καρκινώματα του παχέος εντέρου συμβάλλει ιδιαίτερα στη διάγνωση των όγκων και την επίλυση προβλημάτων διαφορικής διάγνωσης από νεοπλάσματα με παρόμοια χαρακτηριστικά, όπως μεταστατικά καρκινώματα. Επιπλέον, η ανίχνευση αντιγόνων στα νεοπλασματικά κύτταρα επιτρέπει τη διάκριση διαφόρων τύπων καρκινωμάτων του παχέος εντέρου και την αναγνώριση αυτών σε περιπτώσεις όπου η μορφολογία δεν επαρκεί.

Σημαντική είναι επίσης η συμβολή της ανοσοϊστοχημείας στη μελέτη μοριακών βιολογικών δεικτών οι οποίοι χαρακτηρίζουν αυτούς τους όγκους και δίνουν έμμεσες πληροφορίες για τις γονιδιακές μεταβολές που καθορίζουν την έναρξη και προαγωγή της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Οι δείκτες αυτοί αφορούν συνήθως πρωτεϊνικά παράγωγα ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και

διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι αναδύμενες πληροφορίες για τη σημασία αυτών των δεικτών μπορεί να έχουν πολλαπλή χρησιμότητα, από την ικανότητα πρόβλεψης της βιολογικής συμπεριφοράς και τον καθορισμό αποτελεσματικότερης θεραπείας των όγκων αυτών ως τη χρήση τους για τη διάκριση ομάδων ατόμων υψηλού κινδύνου για εμφάνιση ή υποτροπή της νόσου.

Οι μοριακοί ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που ανιχνεύονται με μονοκλωνικά αντισώματα στην παρούσα μελέτη είναι:

- α) η p53 πρωτεΐνη, παράγωγο του p53 γονιδίου,
- β) η MDM2 πρωτεΐνη, παράγωγο του MDM2 γονιδίου,
- γ) η p21 πρωτεΐνη, παράγωγο του WAF1/CIP1 γονιδίου,
- δ) η bcl-2 πρωτεΐνη, παράγωγο του bcl-2 γονιδίου,
- ε) ο παράγοντας πολλαπλασιασμού Ki-67.

Ακολούθως, θα αναλυθεί κάθε ένας από αυτούς τους δείκτες ως προς τη δράση του και τη σημασία του στη γενετική οδό της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου από την μέχρι τώρα γνώση.

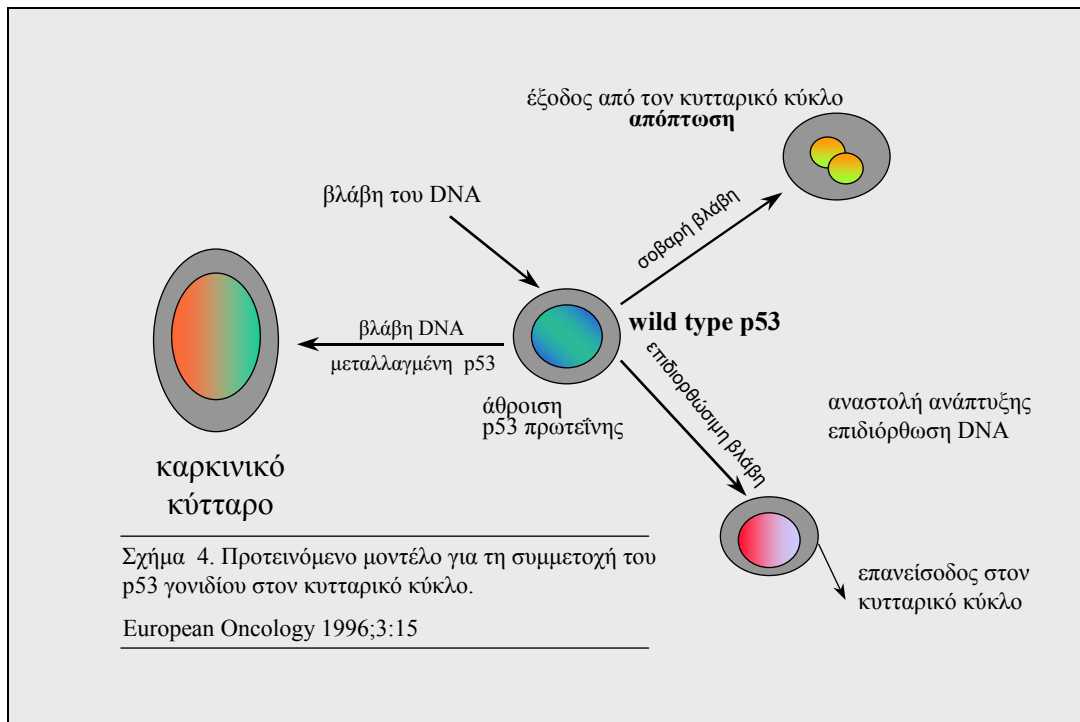


## P53 ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η p53 πρωτεΐνη, που ονομάστηκε έτσι λόγω του μοριακού της βάρους (53 kD), είναι πυρηνική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο p53 που εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17. Αρχικά θεωρήθηκε ότι ήταν καρκινικό αντιγόνο, ενώ η ικανότητα διαφόρων μορφών της να προκαλούν νεοπλασματική αλλαγή σε κυτταρικές σειρές ήταν η αιτία για να καταταχθεί στην κατηγορία των προϊόντων ογκογονιδίων<sup>54,55</sup>. Αποδείχθηκε όμως ότι οι πρωτεΐνες αυτές που ανιχνεύθηκαν ήταν μεταλλαγμένες ή σταθεροποιημένες μορφές της φυσιολογικής p53 πρωτεΐνης<sup>56</sup>. Ο νεοπλασματικός φαινότυπος οφειλόταν στην απώλεια της δράσης της φυσιολογικής p53 πρωτεΐνης, η οποία θεωρήθηκε ότι δρούσε ως αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης. Έτσι το p53 γονίδιο κατατάχθηκε στην κατηγορία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (tumour suppressor genes), απώλεια των οποίων ενέχεται στη νεοπλασματική εξαλλαγή<sup>57</sup>.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμπεριφέρονται ως υπολειπόμενα γονίδια στο κυτταρικό επίπεδο<sup>35</sup>. Δε φαίνεται όμως να ισχύει το ίδιο για το p53 ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο συμπεριφέρεται με επικρατούντα χαρακτήρα, δηλαδή απώλεια του ενός αλληλόμορφου οδηγεί το κύτταρο σε μετασχηματισμό ακόμη κι αν το άλλο αλληλόμορφο είναι φυσιολογικό. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται μερικώς από την αδρανοποίηση της φυσιολογικής p53 πρωτεΐνης (wild-type p53) από τη μεταλλαγμένη (dominant loss of function-κυρίαρχη απώλεια λειτουργίας) είτε από απόκτηση νέων λειτουργιών από τη μεταλλαγμένη p53 (gain of function)<sup>44</sup>.

Η μετάλλαξη του p53 γονιδίου είναι η πιο κοινή γενετική αλλοίωση που έχει βρεθεί και διερευνηθεί σε καρκίνους του ανθρώπου<sup>58</sup>. Η p53 πρωτεΐνη (μεταλλαγμένη p53) έχει βρεθεί σε πολλά νεοπλάσματα και νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές<sup>59</sup>. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί σε καρκινώματα μαστού<sup>60,61</sup>, παχέος εντέρου<sup>62,63</sup>, στομάχου<sup>64</sup>, ήπατος<sup>65</sup>, πνεύμονα<sup>66</sup>, ΚΝΣ<sup>67</sup>, μελανώματα<sup>69</sup>, Hodgkin<sup>70</sup> και non-Hodgkin λεμφώματα<sup>71</sup>, καρκινώματα στοματικής κοιλότητας<sup>72</sup> και λευχαιμίες<sup>73,74</sup>. Το γονίδιο p53 είναι συχνός στόχος μεταλλάξεων<sup>75</sup>. Κι αυτό γιατί περιέχει ευρύ φάσμα στόχων σημειακών μεταλλάξεων (>100) που έχουν ως



αποτέλεσμα τη δημιουργία αλληλόμορφων με ογκογενετική ικανότητα, σε σχέση με άλλα γονίδια όπως για παράδειγμα το *ras*, όπου οι θέσεις που σημειακή μεταλλάξη τους θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση του γονιδίου είναι μόνο έξι<sup>35</sup>.

Η ανάλυση της ακολουθίας των κωδικονίων του p53 γονιδίου (που κωδικοποιεί συνολικά 393 αμινοξέα) στα θηλαστικά, αμφίβια, πτηνά και ψάρια έχει αποκαλύψει πέντε περιοχές (I-V) που έχουν διατηρηθεί κατά την εξέλιξη των ειδών και είναι σημαντικές για τη δράση της. Οι τέσσερις από αυτές βρίσκονται μεταξύ των εξονίων 5 και 8 (περιοχές II-V)<sup>76</sup>. Μεταλλάξεις έξω από τα εξόνια 5 έως 8 είναι πολύ σπάνιες<sup>77</sup>. Οι συνήθεις μεταλλάξεις του p53 γονιδίου είναι οι ονομαζόμενες “μεταλλάξεις αλλαγής του νοήματος” (missense mutations), δηλαδή μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος στην πρωτεΐνη που παράγεται. Οι μεταλλάξεις αλλαγής του νοήματος οδηγούν στην παραγωγή αλλοιωμένης p53 πρωτεΐνης για την οποία φαίνεται να υπάρχει θετική επιλογή στα καρκινικά κύτταρα. Οι περισσότερες "missense" μεταλλάξεις εντοπίζονται στις τέσσερις διατηρημένες κατά την εξέλιξη των ειδών περιοχές που αναφέρθηκαν προηγουμένως και κυρίως στα κωδικόνια 175, 248 και 273 που αποτελούν την επονομαζόμενη «θερμή περιοχή» (hot spot region) του γονιδίου<sup>76</sup>. Αυτή η θερμή περιοχή είναι η θέση που ευθύνεται για τη σύνδεση της p53 σε συγκεκριμένες ακολουθίες του DNA, προκειμένου να ασκήσει τη δράση της<sup>78</sup>.

Γιατί όμως το p53 γονίδιο ενέχεται στους περισσότερους καρκίνους; Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι μέσω του προϊόντος του, της p53 πρωτεΐνης, κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η p53 πρωτεΐνη είναι μία φωσφοπρωτεΐνη που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων, ελέγχοντας την είσοδό τους από τη φάση G1 στην S. Βλάβες στο DNA από διάφορα ερεθίσματα όπως υποξία, υπερϊώδης και ιονίζουσα ακτινοβολία, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, ενεργοποίηση ογκογονιδίων και μόλυνση από συγκεκριμένους ιούς προκαλούν ενεργοποίηση του wild-type p53 μέσω της λειτουργίας του οποίου αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στη φάση G1 προκειμένου να δράσουν οι μηχανισμοί επανόρθωσης (Σχήμα 4). Κυρίως δρα επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (όπως το *waf1-cip1*, για το οποίο γίνεται λόγος σε επόμενο κεφάλαιο) ή και επίσης αναστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (PCNA)<sup>79</sup>. Έτσι άλλωστε εξηγείται και η θέση της στον πυρήνα του κυττάρου. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για την ενεργό συμμετοχή του wild-type p53 και στη διαδικασία επανόρθωσης του DNA μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων που ανήκουν άμεσα ή έμμεσα στους μηχανισμούς επανόρθωσης. Η περιοχή της p53 πρωτεΐνης που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού κωδικοποιείται από την περιοχή I (από τις πέντε διατηρημένες κατά την εξέλιξη περιοχές) του p53 γονιδίου<sup>80</sup>.

Αν η επανόρθωση του DNA δεν είναι δυνατή τότε η wild-type p53 έχει τη δυνατότητα να επάγει την *απόπτωση* του κυττάρου κι έτσι το προφυλάσσει από δυνητική νεοπλασματική μεταμόρφωση (Σχήμα 4)<sup>81</sup>. Η επαγωγή της απόπτωσης προκαλείται είτε διαμέσου της ενεργοποίησης της μεταγραφής (transcriptional activation function) γονιδίων που προάγουν την απόπτωση (πχ *bax*), είτε πιθανόν από γεγονότα που σχετίζονται με τη μετάδοση σήματος (signal transduction) διαμέσου πρωτεϊνικών κινασών.

Συνεπώς, το p53 είναι αποδέκτης σημάτων stress του κυτταρικού περιβάλλοντος (υποξία, μεταβολικές αλλαγές, ενεργοποίηση κυτοκινών, γενετικές βλάβες, ακτινοβολία, μόλυνση από ιούς). Η μετάδοση των σημάτων αυτών με την ενεργοποίηση της λειτουργίας του ως απάντηση στο stress σχετίζεται με κινάσες που ρυθμίζουν (διαμέσου φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης) τις αλληλεπιδράσεις της p53 πρωτεΐνης με άλλα μόρια (*mdm2*) καθώς και τη δράση

της στην επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων (transcriptional activation function) που προάγουν την ανστολή του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό θάνατο<sup>82</sup>.

Προσδιορίζονται έτσι δύο ειδών γεγονότα: αυτά που συμβαίνουν πριν από την ενεργοποίηση της p53, υποδηλώνουν κυτταρικό stress και έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και άθροιση της p53 και αυτά που συμβαίνουν μετά την ενεργοποίηση της p53, η οποία οδηγεί στην κινητοποίηση των κυτταρικών μηχανισμών ως απάντηση στο stress. Οι ιδιότητες της οδού ενεργοποίησης της p53 επηρεάζονται από το είδος του stress και τον τύπο του κυττάρου. Κύτταρα διαφορετικών ιστών μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης της p53<sup>83</sup>.

Η σύνθετη λειτουργία του p53 συμμετέχει στη διατήρηση της γενετικής σταθερότητας και του προσδίδει τη θέση "φρουρού" του κυτταρικού γονιδιώματος<sup>84</sup>. Η ογκοκατασταλτική δράση του έγκειται στο ότι εμποδίζει την εξάπλωση εκείνων των κυτταρικών κλώνων που έχουν αποκτήσει με κάποιον τρόπο βλάβη στο DNA τους, οδηγώντας τα στην απόπτωση. Στην αντίθετη περίπτωση, απώλεια της λειτουργίας του p53 οδηγεί σε αύξηση των πιθανοτήτων εξάπλωσης των κυτταρικών κλώνων με γενετική βλάβη, στους οποίους αν επιδράσουν και άλλοι ογκογενετικοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρική μεταμόρφωση. Αυξάνει, δηλαδή, την πιθανότητα νεοπλασματικής εξαλλαγής. Η επιστροφή του p53 γονιδίου σε ογκογενετική κυτταρική σειρά έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της δυνατότητας ογκογένεσης των κυττάρων<sup>85</sup>. Από την άλλη πλευρά, το μεταλλαγμένο p53 γονίδιο συνεργάζεται με το ras στην μεταμόρφωση κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες<sup>86</sup> και επίσης αυξάνει την ογκογενετική ικανότητα φυσιολογικών κυττάρων<sup>87</sup>. Πάντως από βιολογικής απόψεως δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η μετάλλαξη ή η απενεργοποίηση του p53 αντιπροσωπεύει ένα βήμα-κλειδί που πρέπει να γίνει από τους περισσότερους τύπους νεοπλασματικών κυττάρων, προκειμένου να προχωρήσουν σε επέκταση του κλώνου τους και στη συνέχεια σε επιθετική και μεταστατική νόσο<sup>88</sup>. Η απώλεια μάλιστα της δράσης του p53 αυξάνει την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες<sup>89</sup>.

Επιπλέον, έχει διατυπωθεί και θεωρία που επεκτείνει την παρατήρηση ότι το p53 γονίδιο αποτελεί το σημείο σύγκλισης δια μέσου του οποίου επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών παρουσία βλάβης

στο DNA. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή η λειτουργία του p53 σε αρχικά στάδια της εξέλιξης ήταν να αναγνωρίζει τα γηρασμένα κύτταρα και να τα οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ποια κύτταρα όμως γίνονται αντιληπτά από τους εσωτερικούς μηχανισμούς ελέγχου ως γηρασμένα; Το κύριο ερέθισμα που σηματοδοτεί την κυτταρική γήρανση πιστεύεται σήμερα ότι είναι ο προοδευτικός ακρωτηριασμός των άκρων των χρωματοσωμάτων (διάβρωση των τελομερών - telomere erosion) σε κάθε κύκλο κυτταρικής διαίρεσης των φυσιολογικών σωματικών κυττάρων. Αυτό είναι το αναπόφευκτο αποτέλεσμα της λειτουργίας της DNA-πολυμεράσης που αδυνατεί να επιτύχει την πλήρη αντιγραφή του 3' άκρου (αμινο-τελικό) μιας διπλής DNA αλύσου. Ο ακρωτηριασμός των τελομερών γίνεται αντιληπτός από το κύτταρο ως γήρανση μέσω του p53 που αναγνωρίζει αυτή τη διάβρωση ως βλάβη στο DNA και ενεργοποιεί την αναστολή του πολλαπλασιασμού των “γηρασμένων κυττάρων”. Συνεπώς, φαίνεται ότι η λειτουργία του p53 στους ανώτερους οργανισμούς επεκτάθηκε αποκτώντας την ιδιότητα να αναγνωρίζει και άλλα «γενετικά λάθη» πλην του ακρωτηριασμού των τελομερών των γηρασμένων κυττάρων<sup>90</sup>.

Το αρχικό μοντέλο του Vogelstein συνεπάγεται ότι διαδοχικές γενετικές αλλαγές είναι υπεύθυνες για τη βαθμιαία μετάβαση από το αδένωμα στο καρκίνωμα. Σύμφωνα με αυτό, η μετάλλαξη ή απώλεια του ενός p53 αλληλόμορφου θεωρήθηκε ως ένα από τα τελευταία γεγονότα που επισυμβαίνουν στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, δηλαδή κατά τη μετάβαση ενός αδενώματος με σοβαρή δυσπλασία σε καρκίνωμα<sup>91</sup>.

Υποστηρίχθηκε όμως από τους ίδιους ότι σημαντικότερη είναι η προοδευτική άθροιση γενετικών βλαβών παρά η σειρά με την οποία επισυμβαίνουν<sup>42</sup>. Παρ' όλα αυτά, η διευκρίνιση αργότερα<sup>79</sup> της φυσιολογικής λειτουργίας του p53 στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου υποδεικνύει ότι η θέση του στο μοντέλο των Fearon και Vogelstein είναι εν μέρει σωστή με την έννοια ότι η απώλεια της δράσης του είναι κρίσιμη για τη νεοπλασματική εξαλλαγή και την εμφάνιση κακοήθους φαινότυπου<sup>88</sup>.

Το p53 γονίδιο παρουσιάζει απώλεια του ενός αλληλόμορφου ή μετάλλαξη σε ποσοστό ως 75% των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου<sup>91</sup> και υπερέκφραση της p53 πρωτεΐνης έχει βρεθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε ποσοστά από 42% ως 67% στα καρκινώματα, 8% περίπου στα αδενώματα και 0% στο φυσιολογικό

βλεννογόνο<sup>92,93,94,95</sup>. Επίσης, οι μεταλλάξεις του p53 στα καρκινώματα του παχέος εντέρου σχετίζονται με την ικανότητα μεταστατικής διήθησης του ήπατος<sup>96</sup>.

Τι σημαίνει όμως η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της p53 πρωτεΐνης; Η φυσιολογική p53 πρωτεΐνη (wild type p53) είναι ασταθής (έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής) και δεν μπορεί ν' ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά σε τομές παραφίνης ιστών μονιμοποιημένων σε φορμόλη<sup>77</sup>, παρά μόνο μετά από σύνδεσή της με πρωτεΐνες ιών (όπως το T αντιγόνο του ιού SV40 και η E6 πρωτεΐνη του HPV), που την καθιστούν σταθερή και ανιχνεύσιμη αλλά συγχρόνως την απενεργοποιούν<sup>97</sup> ή μετά από σύνδεση με την πυρηνική πρωτεΐνη mdm-2 που επίσης την απενεργοποιεί, δρώντας ως παλίνδρομος αυτορρυθμιστικός μηχανισμός<sup>98</sup>. Η μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη είναι σταθερή και συνεπώς ανιχνεύσιμη<sup>97</sup>. Στη μελέτη των Bertorelle και συν.<sup>95</sup>, από τα καρκινώματα του παχέος εντέρου στα οποία ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά η p53 πρωτεΐνη, το 26% δεν συνδυαζόταν με σύγχρονη μετάλλαξη του γονιδίου. Άρα, σ' αυτές τις περιπτώσεις η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης δεν οφείλεται σε μετάλλαξη, αλλά σε σύνδεση με άλλα μόρια.

Σύμφωνα με τα παραπάνω η ανοσοϊστοχημεία προσδιορίζει την άθροιση σταθεροποιημένης p53 πρωτεΐνης, η οποία όμως σημαίνει την απώλεια της δράσης της, είτε λόγω μετάλλαξης, είτε λόγω σύνδεσης με άλλα μόρια. Επομένως αντανακλά περισσότερο το κυτταρικό περιβάλλον, παρά την εσωτερική δομή της πρωτεΐνης<sup>97</sup>. Μη μετάλλαξη δε σημαίνει απαραίτητα και λειτουργική πρωτεΐνη. Και η συσσώρευση p53 πρωτεΐνης μπορεί να είναι πιο ενδιαφέρουσα ως προς τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου ως *δείκτης της λειτουργικής κατάστασης του p53 γονιδίου*, παρά ως δείκτης της μετάλλαξης αυτού<sup>95</sup>.

Πράγματι, στη μελέτη των Leahy et al<sup>99</sup>, η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της p53 πρωτεΐνης σε καρκινώματα του παχέος εντέρου είναι ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση, ενώ η εντόπιση του μεταλλαγμένου p53 γονιδίου με SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) δεν σχετιζόταν με την έκβαση της νόσου. Αναφέρει δε, ότι οι επόμενες μελέτες θα πρέπει να διερευνήσουν πιθανές αιτίες σταθεροποίησης της p53 πρωτεΐνης σε εκείνα τα καρκινώματα που δεν ανευρίσκεται αλλοίωση στο επίπεδο του γονιδίου.

Οι πιο πρόσφατες μελέτες εντοπίζονται στα γεγονότα που συμβαίνουν προ της ενεργοποίησης της p53 καθώς και στη σημασία της άθροισης της p53 πρωτεΐνης

στα καρκινικά κύτταρα<sup>100</sup>. Και ενώ είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολλά αίτια ενεργοποίησης της p53, φαίνεται ότι όλα τα τέτοιου είδους σήματα συγκλίνουν σε μία και μοναδική κρίσιμη αλληλεπίδραση, αυτή μεταξύ της p53 και του αρνητικού ρυθμιστή της, της MDM2, που αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο.

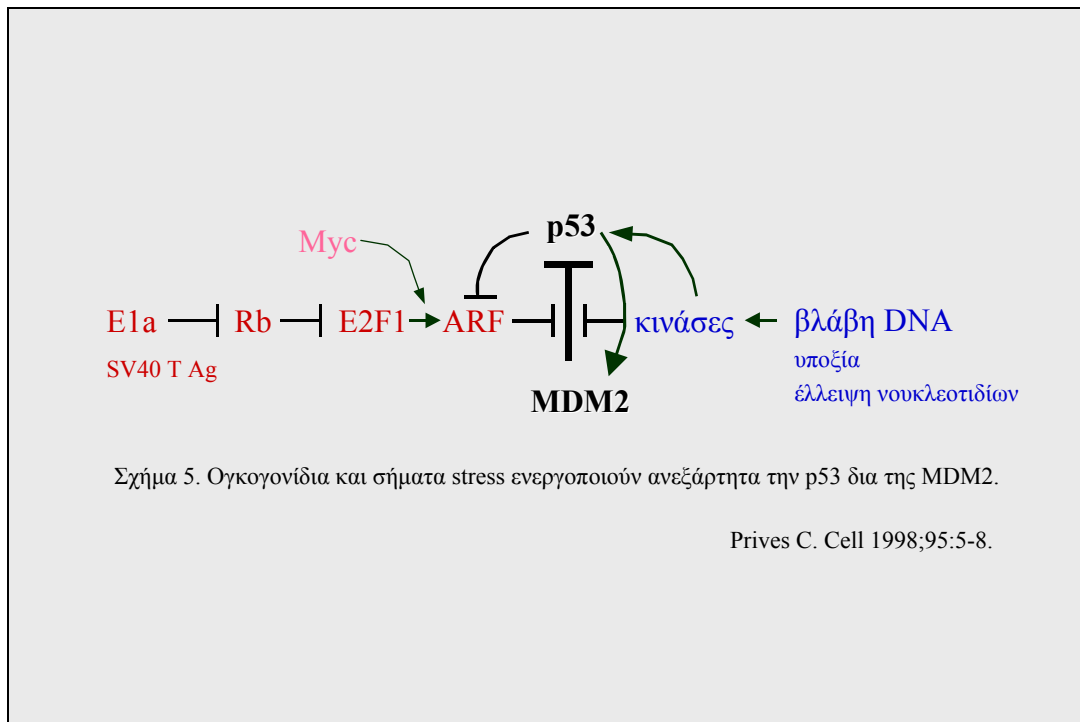
## MDM2 ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η αύξηση της έκφρασης πρωτο-ογκογονιδίων που οφείλεται σε γονιδιακή ενίσχυση μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική μεταμόρφωση ακόμα και επί απουσίας άλλων μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Πρόσφατα, ένα νέο γονίδιο που βρέθηκε σε ποντίκια και ονομάστηκε MDM2 (murine double minute protein) αποδείχθηκε ότι μπορεί να δράσει ως ογκογενετικός παράγοντας όταν υπερεκφράζεται σε NIH3T3 και Rat2 κυτταρικές σειρές<sup>101</sup>. Το ανάλογο του MDM2 γονιδίου στον άνθρωπο απομονώθηκε και χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 12q13-q14, μια περιοχή που βρίσκεται ενισχυμένη σε σαρκώματα του ανθρώπου<sup>102</sup>. Η ανάλυση της ακολουθίας του γονιδίου στα ποντίκια, στους αρουραίους και στους ανθρώπους υποδηλώνει ότι το MDM2 ίσως λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση της μεταγραφής<sup>101-103</sup>.

Η MDM2 πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 90kD, εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου και περιέχει δύο θεωρούμενες περιοχές σύνδεσης μετάλλου, μία από τις οποίες έχει ομοιότητα με τους γνωστούς ενεργοποιητές της μεταγραφής που περιέχουν δακτύλιο ψευδαργύρου. Η MDM2 επίσης περιέχει ένα θεωρούμενο σήμα πυρηνικής εντόπισης και μία οξική δομή του τύπου που βρίσκεται στους ενεργοποιητές της μεταγραφής.

Ο λειτουργικός ρόλος της MDM2 αναγνωρίστηκε βάσει πειραμάτων που αποδεικνύουν ότι η MDM2 σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλεγμα με την wt-p53 *in vivo*. Η λειτουργία της MDM2 είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη. Τα ποντίκια με έλλειψη της πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση. Η θνητότητα λόγω απώλειας της MDM2 αναστρέφεται με τη διαγραφή της p53, υποδηλώνοντας ότι η MDM2 είναι απαραίτητη για την αρνητική ρύθμιση της λειτουργίας της p53<sup>102-104</sup>. Η σύνδεση της MDM2 με την wt-p53 αναστέλλει την ικανότητα του wt-p53 να επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων και αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται από τη σύνδεση της MDM2 στο αμινοτελικό άκρο της wt-p53 (κωδικόνια 15-27), εμποδίζοντας την wt-p53 να έρθει άμεσα σε επαφή με το μεταγραφικό μηχανισμό<sup>103-105</sup>. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλει την ικανότητα του p53 να διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1 και να προκαλεί απόπτωση. Επιπλέον, η σύνδεση με την MDM2 μπορεί να εκτοπίσει την p53 από τον πυρήνα





του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα, προάγοντας την ταχεία αποδόμηση της p53<sup>106</sup>. Αυτή η δράση της MDM2 αποκαλύφθηκε όταν βρέθηκε ότι υπερέκφραση της MDM2 οδηγεί σε μειωμένες ποσότητες της συνεκφραζόμενης p53 και ότι η διακοπή της αλληλεπίδρασης p53-MDM2 λόγω μετάλλαξης έχει ως αποτέλεσμα την άθροιση της p53<sup>83</sup>.

Είναι ενδιαφέρον ότι η wt-p53 φαίνεται να ρυθμίζει θετικά την έκφραση του MDM2 γονιδίου<sup>104</sup>. Η MDM2 όμως δε συνδέεται μόνο με την wt-p53 αλλά και με τη μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη<sup>103</sup>. Συνεπώς η ρύθμιση της έκφρασης του MDM2 από το p53 αντιπροσωπεύει ένα δυνητικό παλίνδρομο αυτορρυθμιστικό έλεγχο της λειτουργίας του p53. Πιθανόν το κυριότερο έργο του MDM2 στα αρχικά στάδια της εξέλιξης να ήταν ο έλεγχος της λειτουργίας του p53 ώστε να αυτοπεριορίζεται η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1<sup>106</sup>.

Σύμφωνα με τα προηγούμενα είναι προφανές ότι η σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 μπορεί να συμβεί με παρεμβολή είτε α) στην αλληλεπίδραση μεταξύ p53-MDM2, είτε β) στην ικανότητα της MDM2 να προκαλεί την αποδόμηση της p53<sup>83</sup>. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί είναι διαπιστωμένο ότι υπάρχουν και μάλιστα είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους και ρυθμίζονται από διαφορετικές οδούς.

Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στη φωσφορυλίωση της p53 από κινάσες που ενεργοποιούνται μετά από βλάβη του DNA και έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53-MDM2. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στη σύνδεση του παράγοντα ARF (alternate reading frame, αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που σχετίζονται με την κυκλίνη D, εντοπίζεται στο γονιδιακό τόπο p16<sup>INK4A</sup>) στην MDM2 που αναστέλλει την ικανότητα της MDM2 να προκαλεί την αποδόμηση της p53<sup>83</sup>. Οι μηχανισμοί αυτοί απεικονίζονται στο σχήμα 5. Στο δεξιό σκέλος του σχήματος, η βλάβη του DNA ενεργοποιεί κινάσες που φωσφορυλιώνουν τη σερίνη στο κωδικόνιο 15 της p53, θέση η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή σύνδεσης της MDM2 στην p53. Το αποτέλεσμα είναι η εξασθένηση της αλληλεπίδρασης p53-MDM2 και συνεπώς η εξασθένηση της ικανότητας της MDM2 να καταστέλλει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού από την p53. Στο αριστερό σκέλος του σχήματος φαίνεται ο τρόπος που επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση της p53 από κυτταρικά και ιικά ογκογονίδια μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα ARF που συνδέεται στην MDM2 και αναστέλλει την ικανότητά της να επιφέρει την αποδόμηση της p53. Επιπλέον, η έκφραση του παράγοντα ARF ρυθμίζεται αρνητικά από την ίδια την p53.

Καθώς η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και ο κυτταρικός θάνατος που δυνητικά επιφέρει η δράση της καθιστούν την p53 “επικίνδυνη πρωτεΐνη”, οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της βρίσκονται σε λεπτή ισορροπία: η p53 ρυθμίζει θετικά την έκφραση του αναστολέα της, της MDM2 και επίσης ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του ενεργοποιητή της, του ARF. Έτσι, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα της p53 διατηρούνται χαμηλά. Μετά από stress, η τροποποίηση της p53 εμποδίζει την αλληλεπίδραση p53-MDM2, ενώ μετά από διαταραχή της ισορροπίας των ογκογονιδίων προάγεται η έκφραση του ARF που εμποδίζει την αποδόμηση της p53 από την MDM2. Το αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις είναι αυξημένα επίπεδα ενεργοποιημένης p53 πρωτεΐνης<sup>83</sup>.

Γονιδιακή ενίσχυση του MDM2 έχει παρατηρηθεί στα σαρκώματα και η άμεση ανάλυση των p53 και MDM2 γονιδίων σε αυτούς τους όγκους υποδηλώνει ότι το ένα ή το άλλο, αλλά όχι και τα δύο μαζί, είναι μεταλλαγμένα στο 70% των περιπτώσεων<sup>102,107</sup>. Έτσι, φαίνεται ότι οι γενετικές αλλοιώσεις στο p53 ή στο MDM2 αντιπροσωπεύουν εναλλακτικούς μηχανισμούς απενεργοποίησης της ίδιας οδού καταστολής της ανάπτυξης σε αυτούς τους όγκους. Η έκφραση της MDM2

έχει μελετηθεί και σε άλλες νεοπλασίες. Σε μερικούς τύπους λευχαιμιών και λεμφωμάτων η MDM2 υπερεκφράζεται χωρίς σύγχρονη γονιδιακή ενίσχυση. Στα λεμφώματα Hodgkin παρατηρείται έκφραση της MDM2 στα κύτταρα Reed-Sternberg σε συνδυασμό με την έκφραση της p53 και αυτό οφείλεται είτε σε σταθεροποίηση της MDM2 λόγω της σύνδεσης με την p53, είτε σε αυξημένη μετάφραση διότι σε αυτά τα νεοπλάσματα δεν παρατηρήθηκε γονιδιακή ενίσχυση ή αυξημένη μεταγραφή του MDM2 γονιδίου<sup>108</sup>.

Στο βρογχογενές καρκίνωμα η υπερέκφραση της MDM2 οφείλεται σε αυξημένη μεταγραφή (όπως φαίνεται από την αύξηση του επιπέδου του mRNA) και όχι σε γονιδιακή ενίσχυση<sup>109</sup>. Από μελέτες νεοπλασμάτων του πλακώδους επιθηλίου φαίνεται ότι η γονιδιακή ενίσχυση που παρατηρείται στα σαρκώματα δεν είναι η αιτία της υπερέκφρασης σε άλλα νεοπλάσματα<sup>110</sup>. Στα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας, δεν έχει βρεθεί καθόλου υπερέκφραση της MDM2 πρωτεΐνης<sup>111</sup>. Από τη μελέτη των Ofner και συν.<sup>112</sup> σε καρκινώματα του παχέος εντέρου, υπερέκφραση της MDM2 πρωτεΐνης έχει βρεθεί σε ποσοστό 20% των όγκων που μελετήθηκαν.

Συμπερασματικά, η σχέση μεταξύ MDM2 και p53 είναι περίπλοκη και όχι πλήρως κατανοητή ως σήμερα. Επομένως, θέτει την ανάγκη για περισσότερες μελέτες που θα διευκρινίσουν τη σημασία της αλληλεπίδρασης και την πιθανή συμμετοχή της στην ογκογένεση.

## P21 ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΚΑΙ WAF-1/CIP-1 ΓΟΝΙΔΙΟ

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αντιληπτό ότι η διαφυγή από τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου είναι κρίσιμη για την ογκογένεση. Ο κυτταρικός κύκλος σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα ρυθμίζεται από πρωτεϊνικά συμπλέγματα που περιέχουν κυκλίνες και κινάσες ρυθμιζόμενες από τις κυκλίνες, τις λεγόμενες κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases-CDKs)<sup>113</sup>. Η δε δράση των CDKs ελέγχεται αρνητικά από μια ομάδα πρωτεϊνών, τις αναστολείς των CDKs (cyclin-dependent kinase inhibitors-CDK-inhibitors), οι οποίες με αυτή τους τη δράση παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Η διαφυγή από αυτό το σημείο ελέγχου μπορεί να σημαίνει την έναρξη της νεοπλασματικής εκτροπής<sup>114</sup>.

Ένας γενικός αναστολέας των CDKs είναι το 21kDa παράγωγο του WAF1/CIP1 γονιδίου, η πρωτεΐνη p21<sup>WAF1/CIP1</sup> που βρίσκεται σε φυσιολογικά αλλά όχι και σε μεταμορφωμένα κύτταρα<sup>41</sup>. Η p21<sup>WAF1</sup> απενεργοποιεί το σύμπλεγμα κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης/κυκλίνης σταματώντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω αναστολής της ικανότητας της CDK να προκαλέσει φωσφορύλιωση. Η p21<sup>WAF1</sup> είναι ισχυρός και συγχρόνως αναστρέψιμος αναστολέας της προόδου του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2 και ενεργοποιείται ως ανταπόκριση σε βλάβη του DNA, πιθανότατα για να δοθεί ο χρόνος που θα επιτρέψει την επιδιόρθωση του DNA. Μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2 οδηγεί σε απόπτωση<sup>115</sup>.

Η μεσολαβούμενη από το wild-type p53 αναστολή της φάσης G1 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της p21<sup>WAF1</sup>. Πιθανότατα η αναστολή της δραστηριότητας των CDKs και κατ' επέκταση η διακοπή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από την p21<sup>WAF1</sup> είναι ο τρόπος με τον οποίο το p53 προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής του WAF1 γονιδίου μπορεί να επάγεται από το p53 ως μέρος του μηχανισμού αναγνώρισης και επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (p53 εξαρτώμενη επαγωγή), όπως για παράδειγμα μετά από τη βλάβη που προκαλείται από υπερϊώδη ακτινοβολία *in vitro* και *in vivo*. Στα νεοπλασματικά κύτταρα που έχουν χάσει την p53 πρωτεΐνη ή περιέχουν μεταλλαγμένη p53 τα επίπεδα της p21<sup>WAF1</sup> μειώνονται δραματικά ή δεν

ανιχνεύεται καθόλου<sup>116</sup>. Ενεργοποίηση του WAF1 όμως μπορεί να συμβαίνει και μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από το p53<sup>117</sup>. Συνεπώς, η έκφραση της p21<sup>WAF1</sup> είναι και p53-εξαρτώμενη και p53-ανεξάρτητη και παρατηρείται ως ανταπόκριση σε ερεθίσματα που προκαλούν μίτωση, σε νεοπλασματικά κύτταρα με μεταλλαγμένη p53 και στα διαφοροποιημένα φυσιολογικά κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται. Επίσης, το WAF1 έχει αναγνωριστεί ως γονίδιο που συμμετέχει στην κυτταρική γήρανση<sup>118</sup>. Η υπερέκφραση, λοιπόν, του γονιδίου WAF1 καταστέλλει την ανάπτυξη, γεγονός που συμφωνεί με τη λειτουργία του πρωτεϊνικού παραγώγου του p21<sup>WAF1</sup> ως αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Και η p21<sup>WAF1</sup> χρησιμεύει στη ολοκλήρωση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που μεσολαβείται από το wild-type p53.

Όπως συνάγεται και από τη δράση της, η p21<sup>WAF1</sup> εκφράζεται στον κυτταρικό πυρήνα. Η έκφραση του WAF1 έχει μελετηθεί σε νεοπλασματικούς και μη-νεοπλασματικούς ιστούς. Στον πνεύμονα, διάχυτη κυψελιδική βλάβη προκαλεί αύξηση της έκφρασης του WAF1 και p53-εξαρτώμενη απόπτωση στα πνευμονοκύτταρα τύπου II<sup>119</sup>. Στο καρκίνωμα του δέρματος εκ πλακωδών κυττάρων η έκφραση της p21<sup>WAF1</sup> σχετίζεται με τη διαφοροποίηση<sup>120</sup>. Έκφραση της p21<sup>WAF1</sup> έχει επίσης παρατηρηθεί στο θυρεοειδικό ιστό, στον προστάτη, στους μύες, στο νεφρό, στους όρχεις και στο επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ αντίθετα, μικρή ή καθόλου έκφραση παρατηρήθηκε στους λεμφαδένες, ήπαρ, σπλήνα, εγκέφαλο και καρδιά.

Από τη μελέτη των El Deiry και συν.<sup>115</sup> σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα παρατηρήθηκε ότι υπάρχει ακριβής τοπογραφική κατανομή της έκφρασης της p21<sup>WAF1</sup> στους φυσιολογικούς ιστούς η οποία διαταράσσεται στους νεοπλασματικούς ιστούς. Ειδικά, όσον αφορά το επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα, υπάρχει εντυπωσιακή διαμερισματοποίηση της έκφρασης. Στο πλακώδες επιθήλιο του οισοφάγου εκφράζεται στις επιφανειακές στιβάδες, όπως επίσης και στο λεπτό έντερο. Στο παχύ έντερο, η p21<sup>WAF1</sup> εκφράζεται στο ανώτερο 1/3 των κρυπτών και στην επιφάνεια του επιθηλίου γεγονός που υποδηλώνει έκφραση στο διαμέρισμα της κρύπτης που δεν πολλαπλασιάζεται. Το αντιγόνο πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1, που εκφράζεται μόνο στα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, παρατηρήθηκε ότι εκφραζόταν στα κύτταρα της βάσης των κρυπτών. Πράγματι, σε διπλή χρώση του επιθηλίου για

την p21<sup>WAF1</sup> και το Ki-67/MIB1 παρατηρήθηκε ότι στη ζώνη μετάπτωσης στο μέσον των κρυπτών, κάθε κύτταρο εξέφραζε αποκλειστικά η την p21<sup>WAF1</sup> ή το Ki-67/MIB1 και ποτέ και τα δύο μαζί. Επιπλέον, η έκφραση της p21<sup>WAF1</sup> ήταν ανεξάρτητη από το p53.

Στα αδενώματα, η έκφραση της περιορίζεται στην επιφάνεια του επιθηλίου και παρατηρείται σε ποσοστό περίπου 20% του συνόλου αυτών των νεοπλασμάτων. Επίσης, η διαμερισματοποίηση της έκφρασης p21<sup>WAF1</sup> και Ki-67/MIB1 διαταράσσεται, με ένα ποσοστό των κυττάρων να εκφράζουν και τις δύο πρωτεΐνες. Συνεπώς, το πρότυπο της έκφρασης της p21<sup>WAF1</sup> που παρατηρείται στο φυσιολογικό επιθήλιο του παχέος εντέρου δεν ισχύει για τα αδενώματα. Πιθανώς, η απώλεια του γονιδίου APC, που επισυμβαίνει πρώιμα κατά τη νεοπλασματική εκτροπή στο επιθήλιο του παχέος εντέρου<sup>121</sup> και οδηγεί σε απώλεια των εξωκυτταρίων σημάτων ρύθμισης της ανάπτυξης που προέρχονται από τη σύνδεση του κυτταροσκελετού με τα παρακείμενα κύτταρα, να διαταράσσει τη διαφοροποίησή τους. Έτσι, καθώς τα κύτταρα μεταναστεύουν στο ανώτερο τμήμα της κρύπτης δεν αποκτούν τις ιδιότητες διαφοροποιημένων, μη-πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων.

Στην ίδια μελέτη εξετάστηκαν και 5 αδενοκαρκινώματα. Στα 4 από αυτά με μετάλλαξη του p53 γονιδίου παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα, έως μηδενικά, της p21<sup>WAF1</sup> στους άτυπους αδενικούς σχηματισμούς που διηθούσαν το εντερικό τοίχωμα. Στο αδενοκαρκίνωμα με wt-p53 παρατηρήθηκε έκφραση της p21<sup>WAF1</sup> σε μερικά κύτταρα με σύγχρονη έκφραση της p53 υποδηλώνοντας ότι η έκφραση της p21<sup>WAF1</sup> ήταν p53-εξαρτώμενη, αλλά και ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της p53 οφειλόταν σε σταθεροποίησή της χωρίς μετάλλαξη, που διατηρούσε όμως τη δραστηριότητά της μια και ήταν δυνατό να επάγει την έκφραση της p21<sup>WAF1</sup>. Στη μελέτη των Doglioni και συν.<sup>122</sup>, η έκφραση της p21<sup>WAF1</sup> στα αδενοκαρκινώματα ήταν ετερογενής και σχετιζόταν με μικρότερο στάδιο και έλλειψη υπερέκφρασης της p53.

Συνεπώς, η διαμερισματοποίηση της έκφρασης της p21<sup>WAF1</sup> που παρατηρείται στο φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου διαταράσσεται πρώιμα κατά τη νεοπλασματική εκτροπή, από το στάδιο του αδενώματος και παρουσιάζει πλήρη αποδιοργάνωση, με χαμηλή έκφραση, στα καρκινώματα<sup>115</sup>.

Πιθανόν άλλοι αναστολείς των CDKs να επηρεάζονται ανάλογα σε νεοπλασίες άλλων οργάνων και η τοπογραφική τους ανάλυση θα προσδώσει νέα διάσταση στη μελέτη της ογκογένεσής τους.

## BCL-2 ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Το πρωτο-ογκογονίδιο bcl-2 που θεωρείται ότι αναστέλλει την απόπτωση ανακαλύφθηκε στη χρωμοσωμική διαμετάθεση t: (14:18) που χαρακτηρίζει το 85% των B-θυλακιωδών λεμφωμάτων<sup>123</sup>. Αυτή η διαμετάθεση προκαλεί υπερέκφραση του bcl-2 δηλαδή μετατροπή του σε ογκογονίδιο και μπορεί επίσης να προκληθεί και από άλλους μοριακούς μηχανισμούς. Η πρωτεΐνη bcl-2 έχει μοριακό βάρος 24-26kD και εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη<sup>124</sup>. Τα περιφερικά λεμφοκύτταρα εκφράζουν φυσιολογικά την bcl-2 πρωτεΐνη, ενώ τα B-κύτταρα στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων, περισσότερα από τα οποία θα πεθάνουν με απόπτωση, δεν εκφράζουν την bcl-2.

Η δράση της bcl-2 πρωτεΐνης φαίνεται να σχετίζεται με το διμερισμό της είτε με συναγωνιστές (bcl-xl), είτε με ανταγωνιστές (bax, bcl-xs). Στην πρώτη περίπτωση έχουμε αναστολή και στη δεύτερη επαγωγή της απόπτωσης<sup>125</sup>. Το bcl-2 μπορεί να αναστείλει την απόπτωση που προκαλείται από ποικίλα φυσιολογικά και παθολογικά ερεθίσματα. Παρά το ότι έχει αποδειχθεί ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης του bcl-2 είναι κρίσιμη για την ικανότητά του να αναστέλλει την απόπτωση, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το ογκογονίδιο ασκεί τη δράση του δεν είναι γνωστός. Υπάρχουν ενδείξεις ότι δρα ως προ-οξειδωτικός παράγοντας ρυθμίζοντας το επίπεδο των διαμεσολαβητών ενεργού οξυγόνου και ελέγχοντας την είσοδο στην απόπτωση<sup>126</sup>. Επιπλέον, το bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από αναστολείς της σύνθεσης του DNA, RNA και πρωτεϊνών και από τα στεροειδή, την κολχικίνη, τη θερμοκρασία και την ακτινοβολία<sup>127</sup>.

Όσον αφορά την πιθανή συμμετοχή του στη δημιουργία κακοήθειας, το bcl-2 δεν θεωρείται ότι μπορεί να οδηγήσει μόνο του στην ανάπτυξη νεοπλασματος. Είναι πιθανότερο ότι, λόγω της αντίστασης στα σήματα που οδηγούν σε απόπτωση, εξασφαλίζει την αύξηση του χρόνου ζωής κυτταρικών κλώνων οι οποίοι μετασχηματίζονται σε κακοήθεις κλώνους μετά από ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων επιπλέον ογκογονιδίων.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τέτοιο ρόλο παίζει η ενεργοποίηση του c-myc μέσω χρωμοσωμικής διαμετάθεσης. Η συνεργασία bcl-2 και c-myc οδηγεί σε αναστολή



της απόπτωσης με σύγχρονη υπερίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και φαίνεται να ενέχεται στη δημιουργία κακοήθων λεμφικών νεοπλασμάτων σε ποντίκια<sup>128,129</sup> αλλά και στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου στον άνθρωπο<sup>40</sup>. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του bcl-2 επηρεάζεται από τη δράση ανδρογόνων και οιστρογόνων, όπως επίσης και από την έκφραση της LMP-1 πρωτεΐνης του ιού EBV. Αυτή η πρωτεΐνη επάγει την έκφραση του bcl-2 και αποτελεί ένα πιθανό μηχανισμό αθανασίας (immortalisation) των Β-λεμφοκυττάρων που μολύνονται από αυτόν τον ιό<sup>130</sup>.

Σημαντικό ρόλο στη δράση του bcl-2 έχει και το γονίδιο p53(wt). Η σχέση p53 και bcl-2 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης μαζί με έναν αριθμό από άλλα μόρια<sup>131</sup>. Η επαγωγή της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης μειώνει την έκφραση της bcl-2 είτε άμεσα, είτε μέσω της αύξησης της bax πρωτεΐνης που είναι ανταγωνιστής της bcl-2<sup>132</sup>. Η σχέση όμως μπορεί να είναι και αντίστροφη. Η έκφραση της bcl-2 καθυστερεί την επέλευση της απόπτωσης που μεσολαβείται από την p53<sup>133</sup>. Τα ευρήματα αυτά από τη βασική έρευνα υποδηλώνουν ότι το bcl-2 και το p53 θα πρέπει να μελετώνται μαζί στους παθολογικούς ιστούς<sup>134</sup>.

Η έκφραση του bcl-2 παρατηρήθηκε πρώτα σε αιμοποιητικά κύτταρα, αλλά εμφανίζεται και σε φυσιολογικούς ιστούς εμβρύων, νεογνών και ενηλίκων, όπου φαίνεται ότι περιορίζεται σε κύτταρα με μακρύ χρόνο ζωής, όπως νευρώνες, βασικά κερατινοκύτταρα και κύτταρα επιδεκτικά σε ορμονικά ερεθίσματα όπως το ενδομήτριο και το μυομήτριο. Η μελέτη νεοπλασματικών ιστών ανέδειξε έκφραση του σε μικροκυτταρικό και εκ πλακώδους επιθηλίου καρκίνωμα πνεύμονα, καρκίνωμα μαστού, θυρεοειδή, προστάτη και στο νευροβλάστωμα<sup>135</sup>.

Το bcl-2 φαίνεται να είναι σημαντικό σε συνεχώς αντικαθιστώμενα επιθήλια που τα κύτταρά τους πεθαίνουν με απόπτωση, όπως για παράδειγμα στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα. Πιθανόν, η αναστολή του κυτταρικού θανάτου στα αναγεννητικά τμήματα των βάσεων των κρυπών είναι απαραίτητη για τη συνεχή αναπλήρωση των επιφανειακών κυττάρων. Όσον αφορά το φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου, η bcl-2 πρωτεΐνη εκφράζεται στο αναγεννητικό τμήμα, στις βάσεις των κρυπών<sup>136</sup>. Σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως στην ελκώδη κολίτιδα, δεν αυξάνεται η έκφραση της bcl-2. Σε υπερπλαστικούς πολύποδες σπάνια παρατηρείται έκφραση της bcl-2. Στα αδενώματα και τα καρκινώματα του παχέος εντέρου η τοπογραφική κατανομή της

έκφρασης διαταράσσεται και η έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης είναι διάχυτη, ανομοιογενής και αυξημένη<sup>137,138,139</sup>. Επιπλέον, διαταραχή της έκφρασης παρατηρείται και στον παρακείμενο του αδενώματος ή του καρκινώματος φυσιολογικό βλεννογόνο, υποδηλώνοντας ότι η ανώμαλη έκφραση της bcl-2 προηγείται της ανάπτυξης της δυσπλασίας. Η έκφραση της bcl-2 παρατηρείται να καταλαμβάνει όλο και μεγαλύτερο μήκος της κρύπτης, επεκτεινόμενη προς την επιφάνεια, όσο πιο κοντά πλησιάζουμε προς το δυσπλαστικό επιθήλιο και καταλαμβάνει όλο το μήκος της κρύπτης στα αμέσως παρακείμενα της δυσπλασίας κύτταρα<sup>137</sup>.

Αναφορικά με τη μελέτη των Kaklamanis και συν.<sup>138</sup> για την έκφραση της bcl-2 και της p53 σε καρκινώματα του παχέος εντέρου, παρατηρήθηκε αντίστροφη σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Υπερέκφραση της p53 συνδυάζεται με απουσία έκφρασης της bcl-2. Πιθανόν η αδρανοποίηση της p53 στα καρκινώματα να σχετίζεται με την απώλεια της bcl-2<sup>138</sup>. Σε άλλες μελέτες από τους Mueller και συν,<sup>29</sup> Bosari και συν.<sup>139</sup> και Scott και συν.<sup>140</sup> δεν παρατηρήθηκε αντίστροφη σχέση σε όλα τα καρκινώματα, αλλά υψηλότερη έκφραση του bcl-2 και ασθενέστερη του p53 στα καρκινώματα τα προερχόμενα από αδενώματα σε σχέση με τα de novo καρκινώματα<sup>29</sup>. Ίσως, στα λιγότερο επιθετικά, προερχόμενα εξ' αδενωμάτων καρκινώματα να είναι αναγκαία η αναστολή της απόπτωσης για να αποκτηθεί ο κακοήθης φαινότυπος, ενώ στα περισσότερα επιθετικά de novo καρκινώματα η άθροιση των απαραίτητων γονιδιακών αλλοιώσεων (όπως του p53) για την απόκτηση του κακοήθους φαινότυπου να επιτυγχάνεται χωρίς να είναι αναγκαία η μακρότερη επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων που προκαλεί η έκφραση του bcl-2.

Πάντως, η έκφραση του γονιδίου bcl-2 στα καρκινώματα του παχέος εντέρου δε βρέθηκε να σχετίζεται με την πρόγνωση ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η έκφραση του bcl-2 δεν είναι δείκτης της επιθετικότητας αυτών των νεοπλασμάτων<sup>139</sup>.

## Ki-67 ANTIGONO

Η βιολογική συμπεριφορά των νεοπλασμάτων χαρακτηρίζεται από ακανόνιστα πρότυπα πολλαπλασιασμού. Οι διαταραχές του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επιτρέπουν την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση που συμμετέχει στην κυτταρική μεταμόρφωση<sup>113</sup>. Ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να είναι ένα ακόμα εργαλείο (μέσον) για την πρόβλεψη της επιθετικότητας των νεοπλασμάτων που μέχρι σήμερα υπολογιζόταν από την ιστολογική διαφοροποίηση και την κλινική σταδιοποίηση<sup>141</sup>.

Συνήθεις μέθοδοι εκτίμησης του πολλαπλασιασμού σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα είναι η κυτταρομετρία ροής και η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του πυρηνικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA-proliferating cell nuclear antigen) και του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67<sup>141</sup>. Η κυτταρομετρία ροής είναι χρονοβόρα διαδικασία, απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και χρησιμοποιεί κυτταρικό διάλυμα που έχει ως επακόλουθο την καταστροφή των μικροανατομικών χαρακτηριστικών των κυττάρων και της ιστικής δομής<sup>142</sup>. Ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του PCNA και του Ki-67 είναι πιο απλές μέθοδοι για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, όμως, δε μπορεί να εκτιμήσει το μήκος του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, είναι μία έμμεση μέθοδος μέτρησης του πραγματικού ρυθμού του πολλαπλασιασμού.

Το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67 ανιχνεύεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1, S, G2, M). Απουσιάζει από τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας, δηλαδή στη G0<sup>143</sup>. Η ποσότητα του αντιγόνου διαφέρει μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, με τη μέγιστη ποσότητα να υπάρχει στις φάσεις G2 και M<sup>144</sup>. Το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB1 συνδέεται με το Ki-67. Το MIB1 αναγνωρίζει το αμιγές Ki-67 αντιγόνο καθώς και ανασυνδυασμένα τεμάχια του Ki-67 μορίου<sup>145</sup>. Η ανοσοϊστοχημική χρώση με αυτό το δείκτη (Ki-67/MIB1) επιτρέπει την *in situ* σήμανση των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, με πολύ καλή μορφολογική ταυτοποίηση των θετικών κυττάρων, σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη<sup>145</sup>. Σύμφωνα με τα προηγούμενα, καθώς και με την αναφορά που έχει γίνει για το Ki-67 στο

προηγούμενο κεφάλαιο, ο δείκτης αυτός ανιχνεύεται στα κύτταρα που βρίσκονται στις βάσεις των κρυπτών του φυσιολογικού βλεννογόνου του παχέος εντέρου, δηλαδή στο τμήμα του βλεννογόνου που πολλαπλασιάζεται, ενώ στα αδενώματα η τοπογραφική αυτή κατανομή διαταράσσεται<sup>115</sup>.

Η σήμανση με το Ki-67/MIB1 παραχωρεί χρήσιμες πληροφορίες για το δείκτη πολλαπλασιασμού πολλών νεοπλασματικών και μη-νεοπλασματικών βλαβών. Σε μελέτη ασθενών με ελκώδη κολίτιδα παρατηρήθηκε υψηλότερος βαθμός θετικότητας στους ασθενείς με ενεργό νόσο σε σύγκριση με αυτούς σε φάση ύφεσης, υποδηλώνοντας ότι η σήμανση με το Ki-67/MIB1 μπορεί να αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη δραστηριότητας της νόσου<sup>146</sup>. Η μελέτη των Vermeulen και συν.<sup>147</sup> στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου ανέδειξε σημαντικά θετική συσχέτιση αγγειοβρίθειας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως αυτός προσδιορίστηκε από το δείκτη Ki-67/MIB1.

Μελέτες σε κακοήθεις όγκους συσχετίζουν υψηλό Ki-67 δείκτη με χαμηλή διαφοροποίηση και προχωρημένο στάδιο. Το επίπεδο έκφρασης του Ki-67/MIB1 βρέθηκε παράλληλο με το βαθμό διαφοροποίησης σε όγκους των οστών<sup>148</sup>, πρωτοπαθή λεμφώματα του στομάχου<sup>149</sup> και Non-Hodgkin λεμφώματα<sup>150</sup>. Στα καρκινώματα του νεφρικού παρεγχύματος, της νεφρικής πυέλου και των ουρητήρων η υψηλή έκφραση του Ki-67/MIB1 σχετιζόταν με χαμηλότερη διαφοροποίηση και προχωρημένα στάδια ενώ στα λεμφώματα η έκφραση ήταν ανάλογη με το βαθμό κακοήθειας<sup>141,151,152</sup>. Στα καρκινώματα του θύμου αδένος η έκφραση του Ki-67/MIB1 ήταν υψηλότερη στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα και χαμηλότερη στα θυμώματα μυελοειδούς τύπου<sup>153</sup>.

Επίσης μελετήθηκε η προγνωστική αξία του δείκτη Ki-67/MIB1 σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων. Χαμηλός δείκτης Ki-67/MIB1 σχετίζεται με μεγαλύτερη επιβίωση σε σαρκώματα μαλακών μορίων<sup>154</sup>, καρκινώματα μαστού χωρίς λεμφαδενική διήθηση<sup>155</sup>, ολιγοδενδρογλοιώματα<sup>156</sup>, καρκινώματα νεφρικού παρεγχύματος<sup>141</sup>, νεφρικής πυέλου<sup>151</sup>, ουρητήρων<sup>151</sup> και ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του οισοφάγου<sup>157</sup>, ενώ σε καρκινώματα του ενδομητρίου μπορεί να είναι προγνωστικός δείκτης για τον κίνδυνο υποτροπής<sup>158</sup>.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ανοσοϊστοχημική χρώση με το Ki-67/MIB1 μπορεί να αποτελεί έναν επιπλέον προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση του ασθενούς. Σε αντίθεση, δε βρέθηκε συσχέτιση με την επιβίωση στα γαστρικά καρκινώματα<sup>159</sup> και στα πρωτοπαθή γαστρικά λεμφώματα<sup>149</sup>. Πιθανόν η σήμανση με το Ki-67 να βελτιώνει την προγνωστική ακρίβεια των συμβατικών μορφολογικών συστημάτων καθορισμού της διαφοροποίησης των νεοπλασιών αλλά και να αποτελεί επιπλέον προγνωστικό δείκτη για την έκβαση της νόσου σε σχέση με άλλες κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να αποτελεί ένα επιπλέον εργαλείο για την πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς συγκεκριμένων όγκων.

## ***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## ΣΚΟΠΟΣ

Η νεοπλασματική εξαλλαγή είναι μια δυναμική, πολυσταδιακή διαδικασία μετατροπής φυσιολογικών κυττάρων σε νεοπλασματικά. Σημαντικό ρόλο σ' αυτήν τη διαδικασία κατέχει η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η διαταραχή της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επιτρέψει την ανεξέλεγκτη επέκταση κυτταρικών κλώνων με γονιδιακές βλάβες, δηλαδή σε γενετική αστάθεια, που σχετίζεται άμεσα με την ογκογένεση.

Το γονίδιο p53 έχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου διατηρώντας τη σταθερότητα του γενετικού κώδικα<sup>79</sup>. Η πλειονότητα της έρευνας για τη δράση του p53 έχει επικεντρωθεί στον τρόπο που ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S και στην ικανότητά του να επάγει απόπτωση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες<sup>79</sup>.

Το p53 ελέγχει αρνητικά τον κυτταρικό κύκλο παρουσία βλαβών στο DNA επάγοντας την έκφραση της p21/waf1 πρωτεΐνης που προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου<sup>116</sup>. Επίσης, επάγει την mdm2 πρωτεΐνη που συνδέεται με την p53 και την αδρανοποιεί, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο παλίνδρομο αυτορρυθμιστικό μηχανισμό<sup>98</sup>. Το p53 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του bcl-2 γονιδίου, το οποίο αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση<sup>132</sup>. Στην προσπάθεια τους να κατανοήσουν τους μηχανισμούς που ενέχονται στη γενετική οδό των νεοπλασιών, οι ερευνητές μελετούν τους κυτταρικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται ή καταστέλλονται στα νεοπλασματικά κύτταρα. Αυτά που μπορούμε να διδαχθούμε από την ανάλυση των αλλοιώσεων ενός συγκεκριμένου γονιδίου εξαρτώνται άμεσα από το βιολογικό περιβάλλον στο οποίο εμφανίζονται.

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημική μέθοδο η έκφραση των p53, mdm2, p21 waf1, bcl-2, πρωτεϊνών σε αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου με σκοπό να αποκτήσουμε έμμεση πληροφόρηση για τους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην ογκογένεση αυτών των νεοπλασμάτων και να συσχετίσουμε την έκφραση τους με την ιστολογική διαφοροποίηση, το στάδιο κατά Dukes' του όγκου και το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1, ώστε να αποκτήσουμε συνδυασμένες πληροφορίες για τους ανοσοφαινότυπους που

εμφανίζονται σ' αυτούς τους όγκους και να εκτιμήσουμε την κλινική τους αξία όσον αφορά στην πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των όγκων αυτών.

## ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της μελέτης προέρχεται από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και αποτελείται από 98 αδενοκαρκινώματα και 11 αδενώματα παχέος εντέρου από μπλοκ παραφίνης ιστών μονιμοποιημένων σε φορμόλη. Τα περιστατικά αντιστοιχούν σε 61 άνδρες και 48 γυναίκες ηλικίας από 57 έως 89 ετών.

Τα καρκινώματα, σύμφωνα με την ιστολογική διαφοροποίηση, διακρίθηκαν σε:

άνωτερης διαφοροποίησης: 25 καρκινώματα,  
μέτριας διαφοροποίησης: 62 καρκινώματα,  
κατώτερης διαφοροποίησης: 11 καρκινώματα (πίνακας 1).  
και σύμφωνα με το στάδιο κατά Dukes' διακρίθηκαν σε:  
σταδίου A κατά Dukes': 17 καρκινώματα,  
σταδίου B κατά Dukes': 36 καρκινώματα,  
σταδίου C κατά Dukes': 45 καρκινώματα (πίνακας 1).

Τα ένδεκα αδενώματα συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ενδεικτικά, για αναζήτηση των προτύπων έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών στα καλοήγη αυτά νεοπλάσματα σε σύγκριση με τα μεταγενέστερα αδενοκαρκινώματα, σύμφωνα με θεωρία για την ακολουθία φυσιολογικού βλεννογόνου-αδενώματος-αδενοκαρκινώματος. Σύμφωνα με το βαθμό ατυπίας διακρίθηκαν σε αδενώματα με

χαμηλού βαθμού δυσπλασία: 2 περιπτώσεις,  
μέτριου βαθμού δυσπλασία: 7 περιπτώσεις,  
σοβαρού βαθμού δυσπλασία: 2 περιπτώσεις.

Οι ιστοί είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμόλης 10% και εμβαπτισθεί σε παραφίνη. Από τα μπλόκ παραφίνης κόπηκαν σε πλακίδια τομές πάχους



3-4μ οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των εν λόγω πρωτεϊνών με ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Επιλέξαμε τομές στις οποίες υπήρχε εκτός από καρκίνωμα, μεταβατικός και παρακείμενος φυσιολογικός βλεννογόνο. Από κάθε περιστατικό χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 2 τομές για κάθε αντίσωμα από διαφορετικά τμήματα του όγκου, ώστε να εκτιμηθεί ορθότερα η έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών, λαμβανομένης υπ' όψιν της ετερογένειας των κυττάρων του όγκου. Για τη συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ p53/mdm2, p53/p21, p53/bcl2 p21/Ki67/MIB1 χρησιμοποιήθηκαν επάλληλες τομές (serial sections).

Σε όλα τα περιστατικά καταγράφηκε η έκφραση των p53, mdm2, p21, bcl-2, Ki-67/MIB1 και στον παρακείμενο φυσιολογικό βλεννογόνο.

Σε 21 περιστατικά παρατηρήθηκε στο παρασκευάσμα υπολειπόμενο τμήμα του αδενώματος από το οποίο προήλθε το αδenoκαρκίνωμα και καταγράφηκε η έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών και στο υπολειπόμενο αδένωμα.

## ΜΕΘΟΔΟΣ

Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 μελετήθηκε με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο αλκαλικής φωσφατάσης (AP) και η έκφραση των πρωτεϊνών mdm-2, p21, bcl-2 και Ki-67 μελετήθηκε με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP)<sup>160</sup>. Έχει παρατηρηθεί ότι η μέθοδος αυτή έχει υψηλότερη ευαισθησία και δίνει πιο καθαρή (έντονη) χρώση σε τομές παραφίνης από τη μέθοδο της υπεροξειδάσης, ανάλογη με αυτή που παρατηρείται και σε νωπούς ιστούς<sup>161</sup>. Τα στάδια της μεθόδου έχουν ως εξής:

**Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση:** Τα πλακίδια τοποθετούνται στον κλίβανο στους 37<sup>0</sup> C επί 18h και κατόπιν στους 56<sup>0</sup> C για 1h. Ακολούθως, εμβαπτίζονται σε 3 διαδοχικά μπανάκια ξυλόλης απο 5' στο κάθε ένα, για να ολοκληρωθεί η αποπαραφίνωση και στη συνέχεια ενυδατώνονται σε κατιούσα οινόπνευμάτων ως εξής: 3X5' σε 100% οινόπνευμα, 3X5' σε 96% , 5' σε 80% και 5' σε 70% οινόπνευμα.

**Τεχνική αποκάλυψης του αντιγόνου:** Κατόπιν ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό, εμβαπτίζονται σε διάλυμα κιτρικού νατρίου και θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων 3X5', στα 750W για τα p53, bcl-2, mdm-2 και στα 500W για τα MIB-1/Ki-67 και WAF1/p21, με μεσοδιαστήματα κρυώματος 5'. Η τεχνική αυτή που περιγράφεται από τον A. Norton βοηθά στην αποκάλυψη των επίτοπων των προς διερεύνηση πρωτεϊνών-αντιγόνων σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη.  
**A.J.Norton. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. J Pathol 1993; 171: 79-80.**

**Προεπόαση:** Αφού τα πλακίδια κρυώσουν για 15' και εκπλυθούν με απεσταγμένο νερό, τοποθετούνται σε TBS (Tris Buffer Solution, pH 7,6) για 2X5' και κατόπιν επωάζονται 30' σε υγρό θάλαμο με αντίσωμα απο φυσιολογικό ορό κουνελιού (normal rabbit serum, DAKO X0902) σε

αραίωση 1:20 σε TBS. Στο στάδιο αυτό δεσμεύονται μη ειδικοί αντιγονικοί παράγοντες του ιστού οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν μη ειδική χρώση.

**Επώαση με το κυρίως αντίσωμα:** Κατόπιν τοποθετείται χωρίς ξέπλυμα των πλακιδίων ένα από τα κυρίως αντισώματα ως εξής:

p53 (D-07, M7001-DAKO) σε αραίωση 1:200 σε TBS και επώαση 2h

bcl-2 (M0887, DAKO) σε αραίωση 1:20 σε TBS και επώαση 2h

mdm-2 (Ab-1, Oncogene, OP46 ) σε αραίωση 1:20 σε TBS και επώαση 18h (over night)

p21/waf1 (Ab-1, Oncogene, OP64 ) σε αραίωση 1:25 σε TBS και επώαση 1h

Ki-67/MIB-1 (Immunotech, 0607 ) αδιάλυτο και επώαση 2h

Σε κάθε τομή τοποθετούνται περίπου 300 μl διαλύματος. Σε όλα τα διαλύματα του κυρίως (μονοκλωνικού) αντισώματος προστίθεται 1:100 BSA ( Bovine serum albumine) προκειμένου να συμπληρώσει-ενισχύσει τη δράση του X0902, δηλαδή να δεσμεύσει τις μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Μετά την επώαση με το κυρίως αντίσωμα οι τομές εμβαπτίζονται σε TBS 2X5'.

**Τεχνική αλκαλικής φωσφατάσης (AP) για την p53 (άμεση ανοσοϊστοχημική τεχνική):**

Ακολούθως για την p53 πρωτεΐνη χρησιμοποιείται η τεχνική αλκαλικής φωσφωτάσης (AP), δηλαδή επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση [D314, DAKO (rabbit anti mouse conjugated alkaline phosphatase immunoglobulines)] σε αραίωση 1:50 σε TBS με προσθήκη 1:20 BSA και επώαση 30'. Το δευτεροταγές αντίσωμα συνδέεται ανοσοενζυμικά με το κυρίως αντίσωμα και η συνδεδεμένη

αλκαλική φωσφατάση ανιχνεύεται από το σύστημα υποστρώματος-χρωμογόνου, που είναι το επόμενο βήμα.

#### **Τεχνική αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (ΑΡΑΑΡ) (έμμεση ανοσοϊστοχημική τεχνική)**

Για τις mdm-2, bcl-2, WAF-1/p21 και MIB-1/Ki-67 εφαρμόζεται η τεχνική αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (ΑΡΑΑΡ) και διπλή ενίσχυση ως εξής:

Το δευτεροταγές αντίσωμα είναι rabbit anti-mouse immunoglobulins (Z0259, DAKO) και χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:25 σε TBS με προσθήκη BSA 1:20 και επώαση 30'. Το αντίσωμα αυτό χρησιμεύει ουσιαστικά ως γέφυρα (bridge antibody) μεταξύ του κυρίως αντισώματος (mouse monoclonal antibody) και του αντισώματος του επόμενου βήματος που είναι mouse conjugated alkaline-antialkaline phosphatase Ig. Το κυρίως αντίσωμα και το αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το σύμπλεγμα αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφατάσης είναι από το ίδιο είδος (mouse), ενώ το bridge antibody πρέπει να είναι από διαφορετικό είδος (rabbit anti-mouse Ig). Μετά την έκπλυση από το Z0259 σε TBS 2X5' τοποθετείται το σύμπλεγμα αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (D0651, DAKO, mouse APAAP immunoglobulins) σε αραιώση 1:25 σε TBS με προσθήκη BSA 1:20 και επώαση 30'.

**Διπλή ενίσχυση:** Η ένταση της αντιδράσης ενισχύεται επαναλαμβάνοντας τα βήματα με το δευτεροταγές αντίσωμα και το ΑΡΑΑΡ σύμπλεγμα (διπλή ενίσχυση), προκειμένου να είναι πιο έντονη η χρωματική αντίδραση.

Η μέθοδος της διπλής ενίσχυσης έχει ως εξής: επανάληψη της επώασης με δευτεροταγές αντίσωμα (Z0259) και ΑΡΑΑΡ σύμπλεγμα (D0651) με 10' χρόνο επώασης, αντίστοιχα και δεύτερη επανάληψη με Z0259 (δευτεροταγές αντίσωμα) και D0651 (σύμπλεγμα ΑΡΑΑΡ) με 5' χρόνο επώασης, αντίστοιχα. Στα ενδιάμεσα βήματα γίνεται πάντα έκπλυση 2X5' με TBS.

## **Χρόση**

Αφού χρησιμοποιηθεί μία απο τις δυο τεχνικές (τεχνική AP για P53 και τεχνική APAAP για το bcl-2 , mdm-2 , WAF/p21, MIB/Ki-67) ακολουθεί έκπλυση των τομών με TBS 2X5' και επώαση με διάλυμα υποστρώματος-χρωμογόνου επί 20'. Ως σύστημα υποστρώματος-χρωμογόνου χρησιμοποιείται το FAST RED, DAKO, K699.

Στη συνέχεια οι τομές πλένονται σε τρεχούμενο νερό για 10' και εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιματοξυλίνης.

Για τις πυρηνικές πρωτεΐνες p53, mdm-2, p21 και Ki-67/MIB-1 τα πλακίδια εμβαπτίζονται 10 φορές στην αιματοξυλίνη, ενώ για την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη bcl-2 τα πλακίδια τοποθετούνται επί 45'' στην αιματοξυλίνη.

Ακολούθως ξεπλένονται σε τρεχούμενο νερό 10-15', καλύπτονται με καλυπτρίδες αφού προηγουμένως έχει τοποθετηθεί Glycergel και είναι έτοιμα για το μικροσκόπιο.

## **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

### **Θετικοί μάρτυρες:**

Θετικός μάρτυρας για το p53 ήταν λεμφαδένας με ανάπτυξη λεμφώματος Hodgkin, θετικός για την p53 πρωτεΐνη.

Θετικός μάρτυρας για το bcl-2 ήταν τομές απο παρασκεύασμα φυσιολογικών αμυγδαλών.

Θετικοί ενδογενείς μάρτυρες για το MIB, την p21 και το mdm-2 , ήταν οι ινοβλάστες και για το bcl-2 τα μικρά λεμφοκύτταρα και οι νευρώνες.

### **Αρνητικοί μάρτυρες:**

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες εφαρμόστηκαν όλα τα βήματα της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου πλην της τοποθέτησης του πρωτοταγούς αντισώματος.

### **Θετικά δείγματα – Αρνητικά δείγματα:**

Αρνητικά θεωρήθηκαν τα καρκινώματα στα οποία δεν παρατηρήθηκε έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης και τα καρκινώματα στα οποία η έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε ποσοστό κάτω του πέντε τοις εκατό (<5%) των νεοπλασματικών κυττάρων, καθώς η ανίχνευση θετικών κυττάρων σε τόσο μικρό ποσοστό δε φαίνεται να έχει βιολογική σημασία για την συμμετοχή της στην παθογένεση του υπό μελέτη όγκου με βάση την εκτίμηση της βιβλιογραφίας.

Η έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης θεωρήθηκε χαμηλή ή υψηλή, όταν το ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων ήταν πέντε ως εικοσιπέντε τοις εκατό (5-25%) ή πάνω από εικοσιπέντε τοις εκατό (>25%), αντίστοιχα.

Όσον αφορά το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1 για τον οποίο όλα τα δείγματα είναι θετικά, εφόσον εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, η έκφρασή του θεωρήθηκε χαμηλή, μέτρια ή υψηλή, όταν το ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων ήταν κάτω από εικοσιπέντε τοις εκατό (<25%), εικοσιπέντε ως πενήντα τοις εκατό (25-50%) ή πάνω από πενήντα τοις εκατό (>50%), αντίστοιχα.

**Στατιστική ανάλυση:** Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το σύστημα SPSS (6.0) για Windows. Εφαρμόστηκε το  $\chi^2$  test για τους πίνακες με δύο μεταβλητές και πρότυπα γραμμικής λογαριθμικής ανάλυσης για την πολυπαραγοντική ανάλυση<sup>162</sup>. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά όταν η τιμή p (p value) είναι μικρότερη από 0.05 και λίαν σημαντικά όταν η τιμή p είναι μικρότερη από 0.01.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Έκφραση της p53 πρωτεΐνης.

**Φυσιολογικός βλεννογόνος:** Στα 97 από τα 98 περιστατικά αδενοκαρκινώματος δεν παρατηρήθηκε έκφραση της p53 πρωτεΐνης στον παρακείμενο φυσιολογικό βλεννογόνο. Σε 1 περιστατικό παρατηρήθηκε θετική χρώση για την p53 σε πυρήνες κυττάρων της βάσης μερικών κρυπτών. Σε κανένα από τα 11 αδενώματα δεν παρατηρήθηκε έκφραση της p53 στον παρακείμενο φυσιολογικό βλεννογόνο.

**Αδενώματα:** Θετική πυρηνική χρώση για την p53 παρατηρήθηκε σε 4 από τα 11 αδενώματα. Τα 2 αδενώματα με χαμηλού βαθμού δυσπλασία και τα 5 από τα 7 αδενώματα με μέτριου βαθμού δυσπλασία ήταν αρνητικά. Και τα 2 αδενώματα με σοβαρού βαθμού δυσπλασία ήταν θετικά για την έκφραση της p53. Έκφραση σε μικρό ποσοστό (5-10%) των κυττάρων του αδενώματος ανευρέθη κυρίως στα αδενώματα με μέτριου βαθμού δυσπλασία (2/7), ενώ έκφραση σε υψηλότερο ποσοστό (10-25%) ανευρέθη στο 1 από τα 2 αδενώματα με σοβαρού βαθμού δυσπλασία.

**Καρκινώματα:** Από τα 98 καρκινώματα, τα 63 ήταν θετικά για την p53 πρωτεΐνη (64%). Η έκφραση της ήταν πυρηνική και κυρίως ετερογενής. Είναι ενδιαφέρον ότι το 80% (50/63) από τις θετικές περιπτώσεις παρουσίαζε έκφραση της p53 σε ποσοστό πάνω από 25% των κυττάρων του όγκου (πίνακας 1).

**Υπολειπόμενο αδένωμα:** Από τα 21 περιστατικά στα οποία παρατηρήθηκε υπολειπόμενο αδένωμα τα 8 ήταν θετικά για την p53 στο τμήμα του υπολειπόμενου αδενώματος (πίνακας 4A).

### Έκφραση της MDM2 πρωτεΐνης.

**Φυσιολογικός βλεννογόμος:** Δεν παρατηρήθηκε έκφραση της mdm2 πρωτεΐνης στον παρακείμενο των αδενωμάτων και των καρκινωμάτων φυσιολογικό βλεννογόνο.

**Αδενώματα:** Θετική πυρηνική χρώση για την mdm2 παρατηρήθηκε σε 8 από τα 11 αδενώματα. Η έκφραση της mdm2 στα αδενώματα ανευρέθη σε

μικρό ποσοστό των κυττάρων (5-10%) και δε σχετιζόταν με το βαθμό της δυσπλασίας.

**Καρκινώματα:** Η mdm2 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 50 από τα 98 καρκινώματα (51%), εμφανίζοντας ετερογενή πυρηνική έκφραση σε ποσοστό κάτω από 25% των κυττάρων σε 28 από τις 50 θετικές περιπτώσεις (56%) και σε πάνω από 25% των κυττάρων στις υπόλοιπες 22 (πίνακας 1).

**Υπολειπόμενο αδένωμα:** Από τα 21 περιστατικά στα οποία παρατηρήθηκε υπολειπόμενο αδένωμα τα 5 ήταν θετικά για την mdm2 στο τμήμα του υπολειπόμενου αδενώματος (πίνακας 4B).

### **ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ P21<sup>WAF1/CIP1</sup> ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.**

**Φυσιολογικός βλεννογόνος:** Η p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (p21) πρωτεΐνη παρατηρήθηκε στον παρακαείμενο φυσιολογικό βλεννογόνο σε 59 από τα 98 καρκινώματα και σε 7 από τα 11 αδενώματα (66/109, 60%), εμφανίζοντας πυρηνική χρώση στα κύτταρα του άνω ημιμορίου και της κορυφής των κρυπτών του βλεννογόνου. Στις 43 περιπτώσεις που δεν παρατηρήθηκε έκφραση της p21 στο φυσιολογικό βλεννογόνο, οι ενδογενείς μάρτυρες (ινοβλάστες) ήταν θετικοί.

**Αδενώματα:** Θετική πυρηνική χρώση για την p21 παρατηρήθηκε σε 10 από τα 11 αδενώματα. Η έκφραση της p21 ανευρέθη σε υψηλό ποσοστό των κυττάρων (>25%) σε 3 αδενώματα αλλά δε σχετιζόταν με το βαθμό της δυσπλασίας. Η διαμερισματοποίηση της έκφρασης που παρατηρείται στο φυσιολογικό βλεννογόνο διατηρήθηκε εν μέρει και στα αδενώματα, αλλά σε 3 από τις 10 θετικές περιπτώσεις η έκφραση της p21 επεκτεινόταν στο κάτω ημιμόριο των δυσπλαστικών κρυπτών και στο δυσπλαστικό τμήμα του αδενώματος.

**Καρκινώματα:** Από τα 98 καρκινώματα τα 71(72,5%) ήταν θετικά για την p21 πρωτεΐνη, εμφανίζοντας πυρηνική έκφραση και ετερογενή κατανομή στο επιφανειακό και στο εν τω βάθει διηθητικό τμήμα του όγκου. Μόνο σε 10 από τις 71 θετικές περιπτώσεις (14%) παρατηρήθηκε έκφραση της p21 σε ποσοστό πάνω από 25% των κυττάρων (πίνακας 1).



**Υπολειπόμενο αδένωμα:** Από τα 20 καρκινώματα στα οποία παρατηρήθηκε υπολειπόμενο αδένωμα τα 17 ήταν θετικά για την p21 στο τμήμα του υπολειπόμενου αδενώματος (πίνακας 4Γ).

#### **ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ BCL-2 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.**

**Φυσιολογικός βλεννογόνος:** Η bcl-2 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 58% (63/109) των περιπτώσεων στον παρακείμενο των αδενωμάτων και των καρκινωμάτων φυσιολογικό βλεννογόνο, εμφανίζοντας κυτταροπλασματική έκφραση σε διάσπαρτα κύτταρα στη βάση και το κάτω τριτημόριο των κρυπτών. Σε όλες τις περιπτώσεις με απουσία έκφρασης της bcl-2 στη βάση των κρυπτών, οι ενδογενείς δείκτες (μικρά λεμφοκύτταρα, νευρώνες) ήταν θετικοί.

**Αδενώματα:** Η bcl-2 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 10 από τα 11 αδενώματα εμφανίζοντας κυτταροπλασματική έκφραση που ανευρέθη σε υψηλό ποσοστό των κυττάρων (>25%) σε 8 από τις 10 θετικές περιπτώσεις αλλά δε σχετιζόταν με το βαθμό της δυσπλασίας. Η τοπογραφική κατανομή της έκφρασης που παρατηρήθηκε στο φυσιολογικό βλεννογόνο δεν διατηρήθηκε στο αδενωματώδες επιθήλιο.

**Καρκινώματα:** Από τα 98 καρκινώματα τα 52 (53%) ήταν θετικά για την bcl-2 πρωτεΐνη, εμφανίζοντας ετερογενή κυτταροπλασματική έκφραση σε μικρό ποσοστό (5-25%) των κυττάρων του όγκου. Μόνο σε 11 από τις 52 θετικές περιπτώσεις (14%) παρατηρήθηκε έκφραση της bcl-2 σε υψηλό ποσοστό (>25%) των κυττάρων (πίνακας 1).

**Υπολειπόμενο αδένωμα:** Από τα 20 περιστατικά στα οποία παρατηρήθηκε υπολειπόμενο αδένωμα τα 13 ήταν θετικά για την bcl-2 στο τμήμα του υπολειπόμενου αδενώματος (πίνακας 4Δ).

#### **ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ KI-67/MIB1 ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ.**

**Φυσιολογικός βλεννογόνος:** Το Ki-67 πυρηνικό αντιγόνο παρατηρήθηκε στον παρακείμενο φυσιολογικό βλεννογόνο στα 98 καρκινώματα και στα 11 αδενώματα, εμφανίζοντας πυρηνική χρώση σε διάσπαρτα κύτταρα των βάσεων των κρυπτών του βλεννογόνου που στις περισσότερες περιπτώσεις

επεκτεινόταν ως το μέσον των κρυπτών. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση του Ki-67 στο άνω ήμισυ και στην κορυφή των κρυπτών.

**Αδενώματα:** Από τα 11 αδενώματα όλα ήταν θετικά για το Ki-67 σε ποσοστό πάνω από 10% των κυττάρων, εμφανίζοντας πυρηνική χρώση. Σε ένα μόνο αδένωμα βρέθηκε έκφραση σε ποσοστό πάνω από 50% των κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ της έκφρασης του Ki-67 και του βαθμού της δυσπλασίας. Η τοπογραφική κατανομή της έκφρασης του Ki-67 που παρατηρήθηκε στο φυσιολογικό βλεννογόνο δε διατηρήθηκε στο αδενωματώδες επιθήλιο. Η έκφραση του Ki-67 επεκτεινόταν στο άνω ημιμόριο των δυσπλαστικών κρυπτών και βρέθηκε στο επιπόλης και εν τω βάθει τμήμα των δυσπλαστικών περιοχών κάθε αδενώματος.

**Καρκινώματα:** Από τα 98 καρκινώματα, 52 (53%) ήταν θετικά για το Ki-67 σε ποσοστό μικρότερο του 25%, 32 (33%) ήταν θετικά σε ποσοστό 25 ως 50% και 14 (14%) ήταν θετικά σε ποσοστό πάνω από 50% των κυττάρων (πίνακας 1). Όλες οι περιπτώσεις ήταν θετικές σε ποσοστό πάνω από 5% των κυττάρων εμφανίζοντας πυρηνική χρώση. Η κατανομή της έκφρασης ήταν ομοιογενής σε 95 περιπτώσεις. Σε δύο περιπτώσεις η έκφραση του Ki-67 παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του όγκου, ενώ σε μία περίπτωση παρατηρήθηκε στο εν τω βάθει, διηθητικό τμήμα του όγκου. Τα κύτταρα σε μίτωση παρουσίασαν έντονη χρώση εμφανίζοντας κυτταροπλασματική έκφραση καθ' ότι στη φάση αυτή του πολλαπλασιασμού δεν υπάρχει πυρηνική μεμβράνη.

**Υπολειπόμενο αδένωμα:** Από τα 20 περιστατικά στα οποία παρατηρήθηκε υπολειπόμενο αδένωμα τα 9 ήταν θετικά για το Ki-67 στο τμήμα του υπολειπόμενου αδενώματος (πίνακας 4E).

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ P53, MDM2, P21<sup>WAF1/CIP1</sup>, BCL2 ΚΑΙ Ki-67/MIB1 ΣΤΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΟ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ ΑΔΕΝΩΜΑ.**

Για κάθε πρωτεΐνη, η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασής της στο τμήμα του υπολειπόμενου αδενώματος, όπου αυτό υπάρχει και της έκφρασής της στο αντίστοιχο καρκίνωμα φαίνεται στον πίνακα 4. Παρατηρείται ότι για όλες τις υπό μελέτη πρωτεΐνες (mdm2, p21, bcl-2, Ki-67) εκτός από την p53, η

συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική, με το ποσοστό της έκφρασης στο καρκίνωμα να είναι παράλληλο με αυτό στο αντίστοιχο υπολειπόμενο αδένωμα ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ ,  $p < 0.001$  και  $p < 0.001$ , αντίστοιχα).

Όσον αφορά την p53, η συσχέτιση δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό της έκφρασης στο καρκίνωμα δεν είναι ούτε παράλληλο, ούτε αντίστροφο, αλλά είναι ανεξάρτητο από το ποσοστό της έκφρασης στο αντίστοιχο υπολειπόμενο αδένωμα. Στον πίνακα 4Α φαίνεται ότι, αν το p53 δεν εκφράζεται στο υπολειπόμενο αδένωμα είναι πολύ πιθανό να εμφανιστεί κατά τη μετάπτωσή του σε καρκίνωμα, ενώ αν εκφράζεται στο υπολειπόμενο αδένωμα θα παραμείνει και στο αντίστοιχο καρκίνωμα.

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ P53 ΚΑΙ MDM2.**

Σε όλα τα καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της mdm2 συνυπήρχε με έκφραση της p53, σε αντίθεση με τα αδενώματα, όπου σε 4 περιπτώσεις παρατηρήθηκε έκφραση της mdm2 χωρίς παράλληλη έκφραση της p53. Οι 2 από τις 4 περιπτώσεις αντιστοιχούσαν στα 2 αδενώματα με χαμηλού βαθμού δυσπλασία, ενώ τα 2 αδενώματα με σοβαρού βαθμού δυσπλασία ήταν θετικά και για τις δύο πρωτεΐνες.

Το ποσοστό της έκφρασης της mdm2 ήταν παράλληλο με το ποσοστό της έκφρασης της p53 ( $\chi^2=69.47$ ,  $p=0.000001$ ,  $p < 0.001$ , πίνακας 2). Είναι ενδιαφέρον ότι το 82% των mdm2 θετικών περιπτώσεων παρουσίαζαν υψηλό ποσοστό έκφρασης ( $>25\%$ ) του p53.

Επιπλέον, σε διαδοχικές τομές από όλες τις περιπτώσεις των καρκινωμάτων παρατηρήθηκε ότι οι περιοχές έκφρασης του p53 και του mdm2 συνέπιπταν, εκτός από μία περίπτωση όπου η αντιστοιχία στην έκφραση παρατηρήθηκε μόνο στην επιφάνεια του όγκου.

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ P53 ΚΑΙ P21<sup>WAF1/CIP1</sup>**

Σε 27 από τα 35 καρκινώματα που ήταν αρνητικά για την p53 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε έκφραση της p21. Το ποσοστό έκφρασης της p21 παρουσιάζει τάση προς αντίστροφη συσχέτιση με το ποσοστό έκφρασης της p53 στα καρκινώματα ( $\chi^2=9.5$ ,  $p=0.049$ ,  $p < 0.05$ , πίνακας 2).

Στις περιπτώσεις με φαινότυπο p53+/p21+ (44 περιπτώσεις), η περιοχή έκφρασης της p53 συνήθως δεν συνέπιπτε με την περιοχή έκφρασης της p53.

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ P53 ΚΑΙ BCL-2.**

Τέσσερις φαινότυποι παρατηρήθηκαν κατά τη συσχέτιση p53/bcl-2: p53+/bcl2+, p53+/bcl2-, p53-/bcl-2+, p53-/bcl-2-, σε 35/98, 28/98, 17/98 και 18/98 περιπτώσεις, αντίστοιχα. Η συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού έκφρασης bcl-2 και p53 δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $\chi^2=1.1$ ,  $p=0.88$ , πίνακας 2). Στις p53+/bcl2+ περιπτώσεις οι περιοχές έκφρασης των δύο πρωτεϊνών άλλοτε συμπίπτουν και άλλοτε διαφέρουν χωρίς να υπερισχύει ένα από τα δύο πρότυπα έκφρασης.

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ KI-67/MIB1 ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΙ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.**

Το Ki-67 αντιγόνο παρατηρήθηκε σε ποσοστό κάτω από 25% των κυττάρων στο 68% των περιπτώσεων ανώτερης διαφοροποίησης (I), σε ποσοστό 25-50% των κυττάρων στο 40% των περιπτώσεων μέτριας διαφοροποίησης (II) και σε ποσοστό πάνω από 50% των κυττάρων στο 46% των περιπτώσεων κατώτερης διαφοροποίησης (III). Η αναλογία θετικότητας του Ki-67 ήταν παράλληλη με το βαθμό της ιστολογικής διαφοροποίησης (πίνακας 1,  $p<0.005$ ). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του Ki-67 και του σταδίου του αδενοκαρκινώματος (πίνακας 1,  $p=0.64$ ).

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ P53 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ, ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67/MIB1.**

Η p53 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 11/17, 20/36 και 32/45 περιπτώσεις σταδίου A, B και C κατά Dukes', αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της p53 με το στάδιο δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=7.7$ ,  $p=0.1$ , πίνακας 1).

Έκφραση της p53 παρατηρήθηκε σε 14/25, 40/62 και 9/11 περιπτώσεις βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης I, II και III, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της p53 με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=9.1$ ,  $p=0.058$ , πίνακας 1).

Η p53 παρατηρήθηκε σε 31/52, 23/32 και 9/14 περιπτώσεις χαμηλού (<25%), μέτριου (25-50%) και υψηλού (>50%) ποσοστού έκφρασης του Ki67/MIB1, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της p53 με την έκφραση του Ki67/MIB1 δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=1.8$ ,  $p=0.76$ , πίνακας 1).

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MDM2 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ, ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67/MIB1.**

Η mdm2 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 7/17, 15/36 και 38/45 περιπτώσεις σταδίου A, B και C κατά Dukes', αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της mdm2 με το στάδιο ήταν στατιστικά σημαντική, εμφανίζοντας ποσοστό έκφρασης παράλληλο με το στάδιο ( $\chi^2=11.1$ ,  $p=0.025$ ,  $p<0.05$  πίνακας 1).

Έκφραση της mdm2 παρατηρήθηκε σε 9/25, 33/62 και 8/11 περιπτώσεις βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης I, II και III, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της mdm2 με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=9.1$ ,  $p=0.058$ , πίνακας 1).

Η mdm2 παρατηρήθηκε σε 24/52, 17/32 και 9/14 περιπτώσεις χαμηλού (<25%), μέτριου (25-50%) και υψηλού (>50%) ποσοστού έκφρασης του Ki67/MIB1, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της mdm2 με την έκφραση του Ki67/MIB1 δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=2.5$ ,  $p=0.63$ , πίνακας 1).

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ P21<sup>WAF1/CIP1</sup> ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ, ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67/MIB1.**

Η p21 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 14/17, 28/36 και 29/45 περιπτώσεις σταδίου A, B και C κατά Dukes', αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της p21 με το στάδιο ήταν στατιστικά σημαντική, εμφανίζοντας ποσοστό

έκφρασης αντιστρόφως ανάλογο με το στάδιο ( $\chi^2=10.33$ ,  $p=0.035$ ,  $p<0.05$  πίνακας 1).

Έκφραση της p21 παρατηρήθηκε σε 20/25, 45/62 και 6/11 περιπτώσεις βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης I, II και III, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της p21 με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=8.8$ ,  $p=0.064$ , πίνακας 1).

Η p21 παρατηρήθηκε σε 37/52, 21/32 και 13/14 περιπτώσεις χαμηλού (<25%), μέτριου (25-50%) και υψηλού (>50%) ποσοστού έκφρασης του Ki67/MIB1, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της p21 με την έκφραση του Ki67/MIB1 δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=5.1$ ,  $p=0.27$ , πίνακας 1).

#### **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ BCL2 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ, ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67/MIB1.**

Η bcl-2 πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 11/17, 17/36 και 24/45 περιπτώσεις σταδίου A, B και C κατά Dukes', αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της bcl-2 με το στάδιο δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=3.2$ ,  $p=0.52$ , πίνακας 1).

Έκφραση της bcl-2 παρατηρήθηκε σε 15/25, 30/62 και 7/11 περιπτώσεις βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης I, II και III, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της bcl-2 με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=1.8$ ,  $p=0.76$ , πίνακας 1).

Η bcl-2 παρατηρήθηκε σε 25/52, 19/32 και 8/14 περιπτώσεις χαμηλού (<25%), μέτριου (25-50%) και υψηλού (>50%) ποσοστού έκφρασης του Ki67/MIB1, αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της bcl-2 με την έκφραση του Ki67/MIB1 δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\chi^2=3.9$ ,  $p=0.41$ , πίνακας 1).

#### **ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Στον πίνακα 3 φαίνονται οι ανοσοφαινότυποι από τη συνδυασμένη έκφραση των p53, mdm2, p21<sup>waf1</sup>, bcl-2 πρωτεϊνών. Η πολυπαραγοντική

ανάλυση των 7 μεταβλητών (p53, mdm2, p21<sup>waf1</sup>, bcl-2, Ki-67, στάδιο κατά Dukes', διαφοροποίηση) έδωσε τα εξής αποτελέσματα:

- α) Bcl-2: είναι ανεξάρτητη από όλες τις άλλες μεταβλητές,
- β) Ki-67/διαφοροποίηση: συνδυάζονται θετικά μεταξύ τους και είναι ανεξάρτητες από τις άλλες μεταβλητές,
- γ) mdm2/στάδιο: έχουν παράλληλη σχέση  
p21<sup>waf1</sup>/στάδιο: έχουν αντίστροφη σχέση
- δ) η p53 σχετίζεται θετικά με την mdm2, εμφανίζει τάση για αρνητική συσχέτιση με την p21<sup>waf1</sup> και είναι ανεξάρτητη από τις άλλες μεταβλητές.

Η σχέση p53/mdm2 είναι σταθερή και ανεξάρτητη από την p21<sup>waf1</sup>.

Η σχέση p53/ p21<sup>waf1</sup> είναι περίπλοκη. Ο βαθμός συσχέτισης μεταβάλλεται ως προς την mdm2. Όταν η mdm2 είναι αρνητική, η σχέση p53/p21<sup>waf1</sup> είναι αντίστροφη με υψηλό βαθμό στατιστικής σημαντικότητας. Όταν η mdm2 είναι θετική, η p21<sup>waf1</sup> είναι ανεξάρτητη από την p53.

## ***ΠΙΝΑΚΕΣ – ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ***



**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των p53, mdm2, p21, bcl-2, συσχετιζόμενη με το βαθμό διαφοροποίησης, το στάδιο κατά Dukes' και τον παράγοντα πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του Ki67/MIB1 συσχετιζόμενη με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο κατά Dukes'.**

	Βαθμός Διαφοροποίησης			Στάδιο κατά Dukes'			Ki-67/MIB1			Συν.
	I	II	III	A	B	C	<25%	25-50%	>50%	
<b>p53</b>										
0, <5%	11	2	2	6	16	13	21	9	5	35
5-25%	6	7	0	5	4	4	7	5	1	13
>25%	8	33	9	6	16	28	24	18	8	50
	$\chi^2=9.1, p=0.058$			$\chi^2=7.7, p=0.1$			$\chi^2=1.8, p=0.76$			
	ns			ns			ns			
<b>mdm2</b>										
0, <5%	16	29	3	10	21	17	28	15	5	48
5-25%	8	17	3	7	9	12	15	9	4	28
>25%	1	16	5	0	6	16	9	8	5	22
	$\chi^2=9.1, p=0.058$			$\chi^2=11.1, p=0.025$			$\chi^2=2.5, p=0.63$			
	ns			p<0,05*			ns			
<b>p21<sup>waf1</sup></b>										
0, <5%	5	17	5	3	8	16	15	11	1	27
5-25%	14	41	6	9	25	27	32	19	10	61
>25%	6	4	0	5	3	2	5	2	3	10
	$\chi^2=8.8, p=0.064$			$\chi^2=10.33, p=0.035$			$\chi^2=5.1, p=0.27$			
	ns			p<0.05*			ns			
<b>bcl-2</b>										
0, <5%	10	32	4	6	19	21	27	13	6	46
5-25%	12	24	5	10	12	19	22	14	5	41
>25%	3	6	2	1	5	5	3	5	3	11
	$\chi^2=1.8, p=0.76$			$\chi^2=3.2, p=0.52$			$\chi^2=3.9, p=0.41$			
	ns			ns			ns			
<b>Ki67</b>										
<25%	17	32	3	11	20	21				52
25-50%	4	25	3	5	10	17				32
>50%	4	5	5	1	6	7				14
Σύνολο	25	62	11	17	36	45	52	32	14	98
	$\chi^2=15, p=0.0046$			$\chi^2=2.5, p=0.64$						
	p<0.005**			ns						

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση (σε αριθμό περιστατικών) των mdm2, p21, bcl-2, συσχετιζόμενη με την έκφραση του p53.**

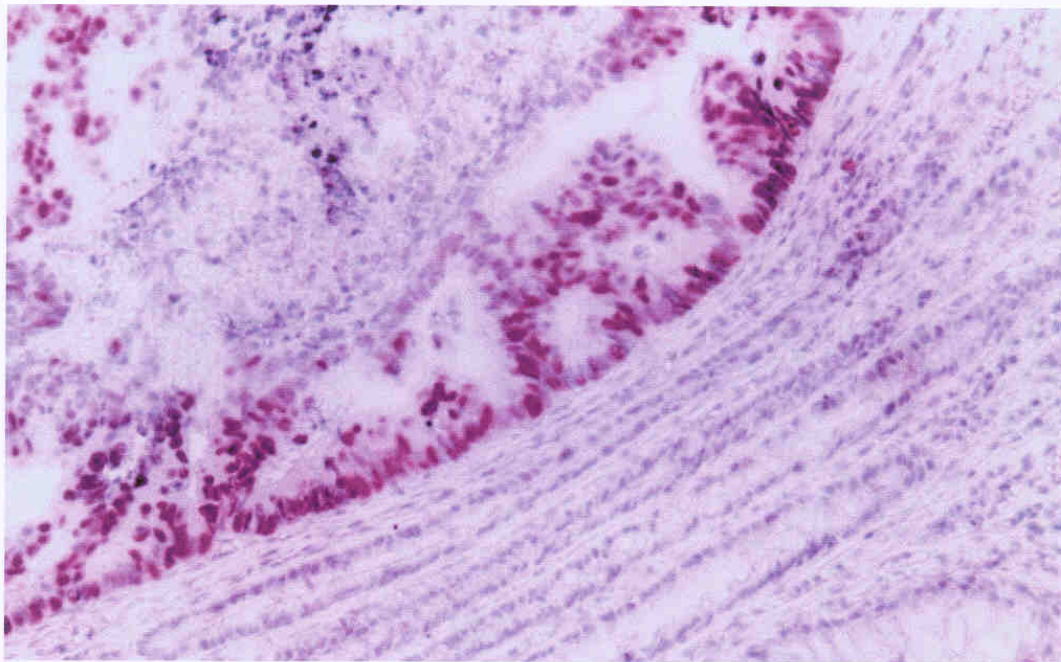
	p53			
	0, <5%	5-25%	>25%	
<b>mdm2</b>				
0, <5%	35	4	9	48
5-25%	0	9	19	28
>25%	0	0	22	22
$\chi^2=69.47, p=0.000001, p<0.001^{***}$				
<b>p21<sup>waf1/cip1</sup></b>				
0, <5%	8	0	19	27
5-25%	24	10	27	61
>25%	3	3	4	10
$\chi^2=9.5, p=0.049, p<0.05^*$				
<b>bcl-2</b>				
0, <5%	18	7	21	46
5-25%	13	5	23	41
>25%	4	1	6	11
Σύνολο	35	13	50	98
$\chi^2=1.1, p=0.88, NS$				

**Πίνακας 3. Συχνότητα κάθε ανοσοφαινότυπου όσον αφορά τη συνδυασμένη έκφραση των p53, mdm2, p21<sup>waf1</sup>, bcl-2.**

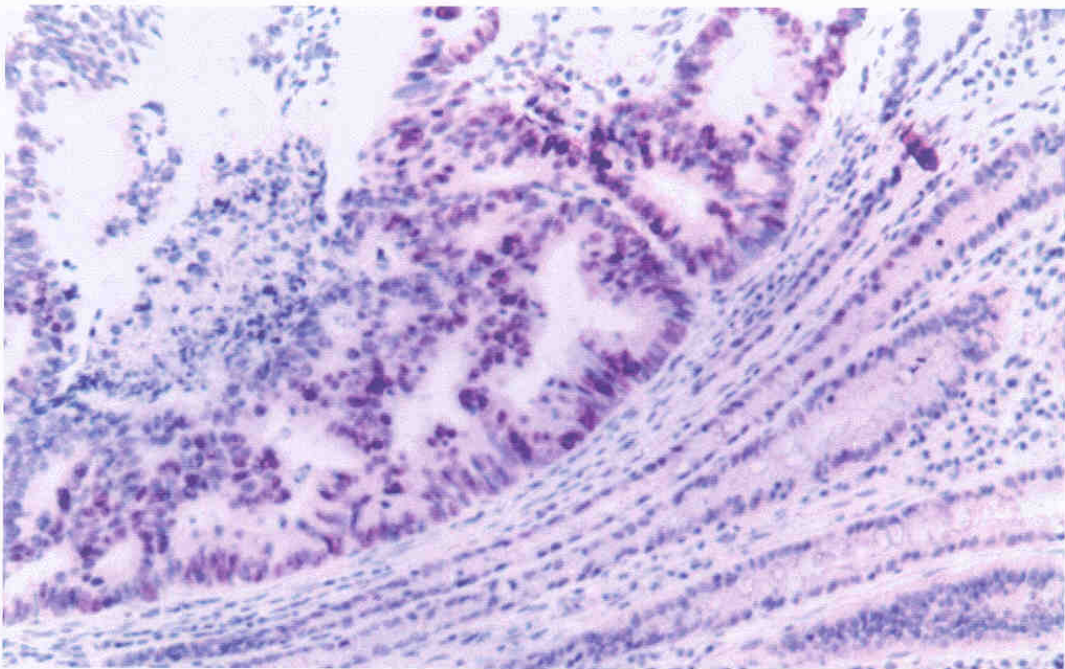
p53	mdm2	p21 <sup>wa</sup>	Bcl-2	Αριθμός περιστατικών	Ποσοστό %
+	+	-	-	8	8.2
+	+	-	+	6	6.1
+	+	+	-	16	16.3
+	+	+	+	20	20.4
+	-	-	-	2	2
+	-	-	+	3	3.1
+	-	+	-	2	2
+	-	+	+	6	6.1
-	+	-	-	0	0
-	+	-	+	0	0
-	+	+	-	0	0
-	+	+	+	0	0
-	-	-	-	2	2
-	-	-	+	6	6.1
-	-	+	-	16	16.3
-	-	+	+	11	11.2
Σύνολο				98	100

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των p53 (4Α), mdm2 (4Β), p21 (4Γ), bcl-2 (4Δ) και Ki-67 (4Ε) στο αδενοκαρκίνωμα συσχετιζόμενη με την έκφραση στο αντίστοιχο υπολειπόμενο αδένωμα (p53ResAD, mdm2ResAD, p21ResAD, bcl-2ResAD, Ki-67ResAD).**

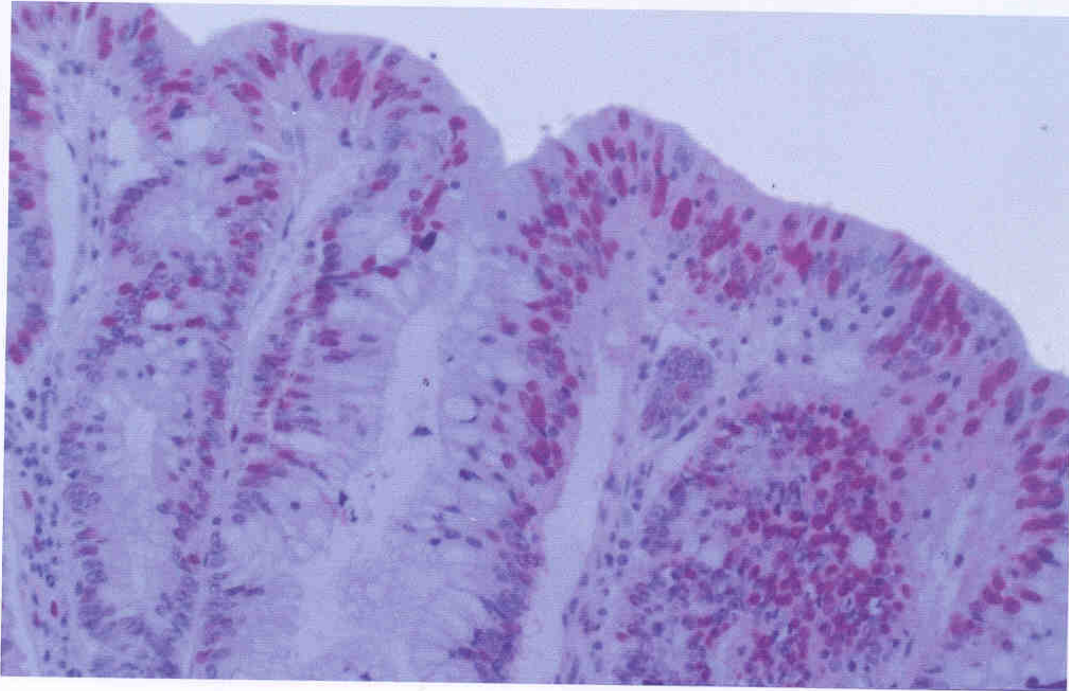
<b>A</b>					<b>B</b>				
<b>p53</b>					<b>mdm2</b>				
	0,<5%	5-25%	>25%	Σ		0,<5%	5-25%	>25%	Σ
<b>p53 ResAD</b>					<b>mdm2 ResAD</b>				
0, <5%	5	4	4	13	0, <5%	11	4	1	16
5-25%	1	1	5	7	5-25%	0	3	1	4
>25%	0	0	1	1	>25%	0	0	1	1
Σύνολο	6	5	10	21	Σύνολο	11	7	3	21
$\chi^2=4.18, p=0.38$					$\chi^2=12.3, p=0.014$				
NS					$p<0.05^{**}$				
<b>Γ</b>					<b>Δ</b>				
<b>p21</b>					<b>bcl-2</b>				
	0,<5%	5-25%	>25%	Σ		0,<5%	5-25%	>25%	Σ
<b>p21 ResAD</b>					<b>bcl-2 ResAD</b>				
0, <5%	2	1	0	3	0, <5%	7	0	0	7
5-25%	1	10	1	12	5-25%	1	8	2	11
>25%	0	0	5	5	>25%	0	0	2	2
Σύνολο	3	11	6	20	Σύνολο	8	8	4	20
$\chi^2=22.1, p=0.0002$					$\chi^2=24.1, p=0.00008$				
$p<0,005^{**}$					$p<0.001^{**}$				
<b>E</b>									
<b>Ki67</b>									
	<25%	25-50%	>50%	Σ					
<b>Ki67 ResAD</b>									
<25%	11	0	0	11					
25-50%	0	5	1	6					
50%	0	1	2	3					
Σύνολο	11	6	3	20					
$\chi^2=20, p=0.00005$									
$p<0.001^{**}$									



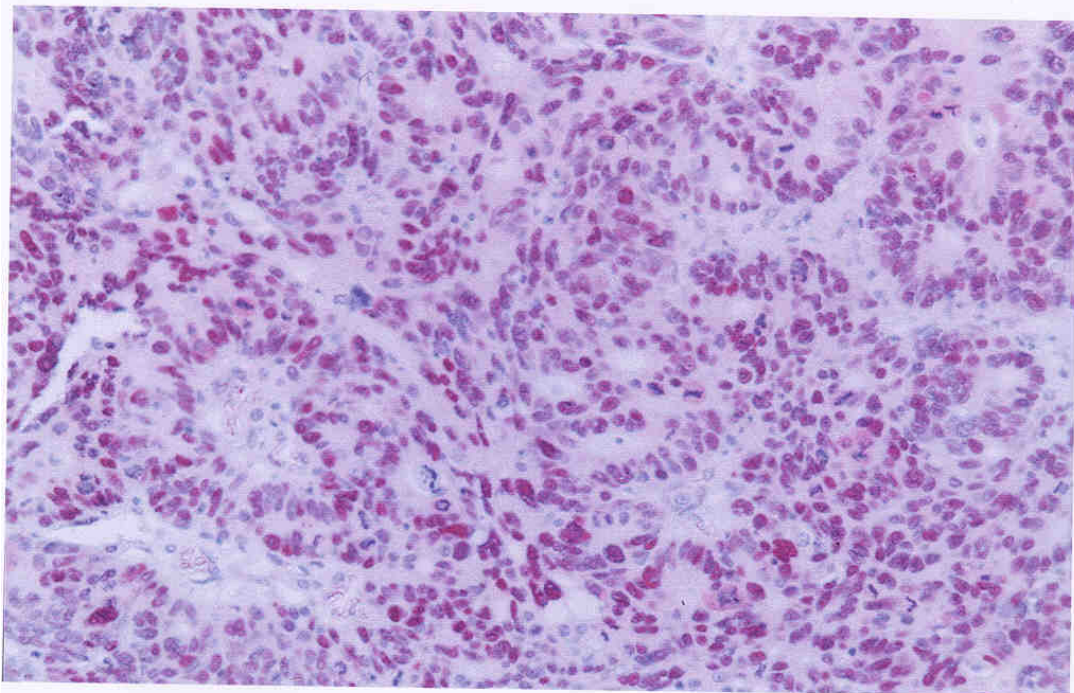
Εικόνα 1. Έκφραση της p53 πρωτεΐνης σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (x200).



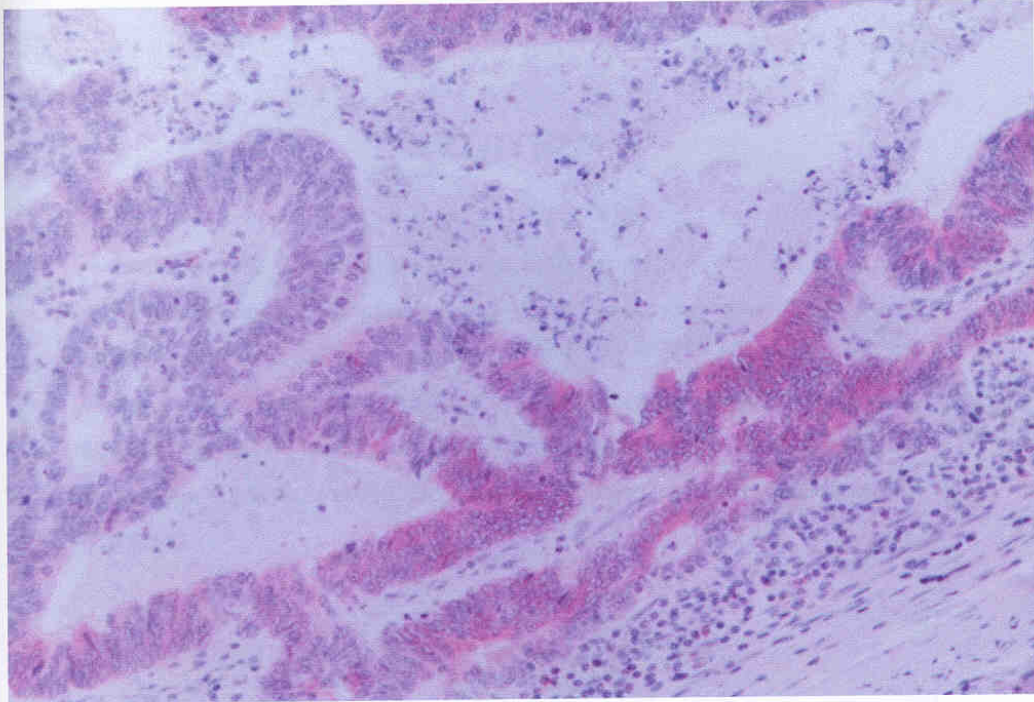
Εικόνα 2. Έκφραση της mdm2 πρωτεΐνης στο ίδιο αδενοκαρκίνωμα (x200).



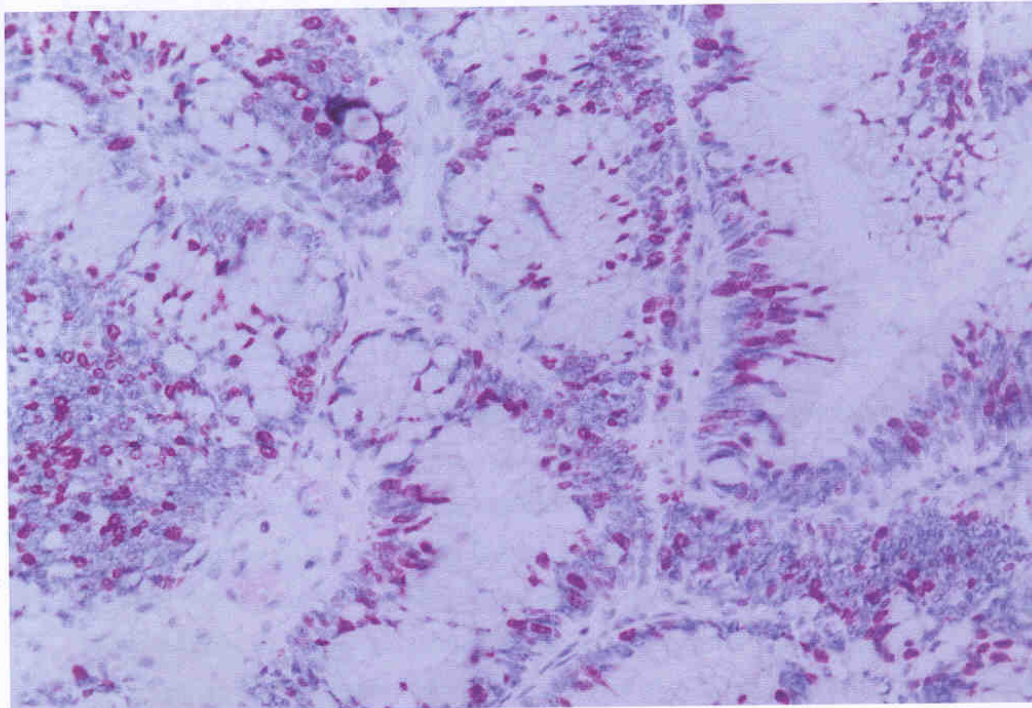
Εικόνα 3. Έκφραση της p21/waf1 πρωτεΐνης σε αδένωμα παχέος εντέρου (x200).



Εικόνα 4. Έκφραση της p21/waf1 πρωτεΐνης σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (x200).



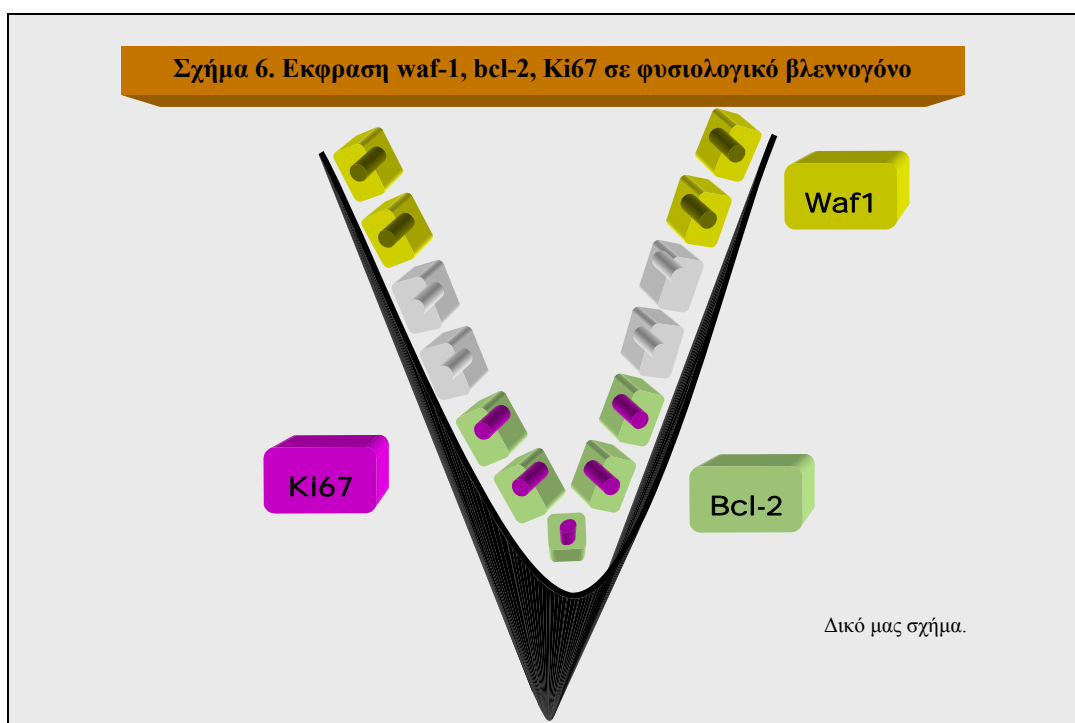
Εικόνα 5. Κυτταροπλασματική έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (x200).



Εικόνα 6. Έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1 σε βλενώδες αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (x200).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

**Φυσιολογικός βλεννογόνος:** Οι παρατηρήσεις μας στον παρακείμενο των αδενωμάτων και καρκινωμάτων φυσιολογικό βλεννογόνο συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών<sup>25,112,115,122,135,137,138,139</sup>. Η έκφραση του Ki-67 και της bcl-2 εντοπίζεται στη βάση και στο κάτω ήμισυ των κρυπτών, ενώ η έκφραση της p21<sup>waf1</sup> εντοπίζεται στο διαφοροποιημένο, μη πολλαπλασιαζόμενο τμήμα των κρυπτών, δηλαδή στο ανώτερο ημιμόριο και στην κορυφή αυτών (Σχήμα 6).



Η p53 και η mdm2 δεν εκφράζονται στον παρακείμενο φυσιολογικό βλεννογόνο. Το ότι η p53 δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό βλεννογόνο είναι αναμενόμενο αφού, ακόμα και όταν επάγεται στο κύτταρο, η wt p53 δεν είναι ανιχνεύσιμη όταν είναι λειτουργική. Η έκφραση της p53 στα κύτταρα μερικών κρυπτών του φυσιολογικού βλεννογόνου σε μία περίπτωση από τις εκατόν εννέα πιθανόν να αντιπροσωπεύει περιοχή του βλεννογόνου με αρχόμενη διαταραχή των φυσιολογικών κυτταρικών μηχανισμών και πρόιμη μετάλλαξη ή



αδρανοποίηση του p53. Η mdm2, υπό φυσιολογικές συνθήκες πολλαπλασιασμού των κυττάρων του βλεννογόνου, πιθανόν είτε να μην επάγεται από την p53, είτε να επάγεται σε πολύ μικρό, μη ανιχνεύσιμο ποσοστό.

**Αδενώματα:** Έκφραση των p53, mdm2, p21<sup>waf1</sup>, bcl-2, Ki-67, παρατηρήθηκε σε 4/11, 8/11, 10/11, 10/11, 11/11 περιπτώσεις, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις p21<sup>waf1</sup>, bcl-2 και Ki-67, που υπό κανονικές συνθήκες εκφράζονται στο φυσιολογικό βλεννογόνο, στα αδενώματα η έκφρασή τους συνεχίζει να παρατηρείται, αλλά διαταράσσεται η τοπογραφική κατανομή της. Στο επιθήλιο στα όρια του αδενώματος με το φυσιολογικό βλεννογόνο, η έκφραση της Ki-67 και της bcl-2 επεκτείνεται στο ανώτερο ημιμόριο και την κορυφή των κρυπτών, ενώ η έκφραση της p21<sup>waf1</sup> επεκτείνεται προς τη βάση των κρυπτών. Στα αδενώματα, η έκφραση της p21<sup>waf1</sup> σε 7/11 περιπτώσεις παρατηρείται στο επιφανειακό τμήμα, ενώ σε 3/11 περιπτώσεις επεκτείνεται σε όλη την περιοχή του αδενώματος, η Ki-67 εκφράζεται σε όλη την περιοχή του αδενώματος και η bcl-2 εκφράζεται ανομοιογενώς σε όλη την περιοχή του αδενώματος. Κατά συνέπεια, οι περιοχές έκφρασης των Ki-67 και p21<sup>waf1</sup> αλληλοεπικαλύπτονται, διαταράσσοντας τη διαμερισματοποίηση της έκφρασης που παρατηρείται στο φυσιολογικό επιθήλιο<sup>115</sup>, όμως, η παρουσία των p21<sup>waf1</sup> και bcl-2 δε σχετίζεται με το βαθμό της δυσπλασίας, εύρημα που συμφωνεί με τη θεώρηση των διαταραχών αυτών ως “πρώιμων” στην ακολουθία “φυσιολογικός βλεννογόνος-αδένωμα-αδenoκαρκίνωμα”.

Αναφορικά με τις mdm2 και p53, που δεν παρατηρούνται συνήθως στο φυσιολογικό βλεννογόνο, η ανίχνευσή τους στα αδενώματα αποτελεί ένδειξη διαταραχής των φυσιολογικών κυτταρικών μηχανισμών. Αν και ο αριθμός των αδενωμάτων είναι μικρός για τη διενέργεια στατιστικής ανάλυσης, παρατηρούμε ότι η έκφραση της p53 στα αδενώματα δεν είναι συχνή και όταν υπάρχει, σχετίζεται με το βαθμό της ατυπίας. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τη θεώρηση της αλλοίωσης του p53 ως “όψιμης” στην ακολουθία “φυσιολογικός βλεννογόνος-αδένωμα-αδenoκαρκίνωμα”<sup>42</sup>.

**Υπολειπόμενα αδενώματα:** Από τη στατιστική ανάλυση των στοιχείων που αφορούν στη σύγκριση της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών στο τμήμα του υπολειπόμενου αδενώματος (όπου υπήρχε) σε σχέση με το

αντίστοιχο καρκίνωμα παρατηρήθηκε ότι, όσον αφορά τις mdm2, p21, bcl-2 και Ki-67, η έκφρασή τους είναι παράλληλη μεταξύ υπολειπόμενου αδενώματος-καρκινώματος. Δηλαδή, για κάθε μία από τις πρωτεΐνες mdm2, p21 και bcl-2, δεν αλλάζει η έκφραση κατά τη μετάπτωση από το αδένωμα στο αντίστοιχο καρκίνωμα. Όταν δεν εκφράζεται στο αδένωμα είναι πιθανότερο να μην εκφράζεται και στο αντίστοιχο καρκίνωμα και το αντίθετο. Πρόκειται για αλλοιώσεις στην έκφραση που αποκτώνται πρώιμα στην ακολουθία “φυσιολογικός βλεννογόνος-αδένωμα-αδενοκαρκίνωμα”<sup>25</sup>.

Συγκεκριμένα για το δείκτη πολλαπλασιασμού, όπως φαίνεται από τον αριθμό των κυττάρων που είναι σε φάση πολλαπλασιασμού (ποσοστό Ki-67+), δεν αλλάζει από το αδένωμα στο καρκίνωμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτες διακυμάνσεις και άλλοι παράγοντες, όπως για παράδειγμα χαμηλός ρυθμός απόπτωσης σε συνδυασμό με συσσώρευση γονιδιακών αλλοιώσεων<sup>42,163</sup> είναι υπεύθυνοι για την απόκτηση του κακοήθους φαινοτύπου.

Όσον αφορά την p53, η έκφρασή της στο καρκίνωμα είναι ανεξάρτητη από την έκφραση στο αντίστοιχο προϋπάρχον αδένωμα. Τα περισσότερα υπολειπόμενα αδενώματα είναι αρνητικά για την p53 (13/20) και τα περισσότερα από τα αρνητικά υπολειπόμενα αδενώματα (8/13) εκφράζουν την p53 στο αντίστοιχο καρκίνωμα, πράγμα που συμφωνεί με τη θεώρηση της αλλοίωσης του p53 ως όψιμου γεγονότος στη γενετική οδό της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου<sup>42</sup>. Από την άλλη πλευρά, μερικά υπολειπόμενα αδενώματα ήδη εκφράζουν την p53 (7/20) και τα περισσότερα από αυτά (6/20) θα συνεχίσουν να την εκφράζουν στο αντίστοιχο καρκίνωμα, ενώ σπανίως (1/20) παρατηρείται απώλεια της έκφρασης στο καρκίνωμα εφόσον υπάρχει στο αντίστοιχο υπολειπόμενο αδένωμα.

Δηλαδή, αν το p53 δεν υπάρχει στο υπολειπόμενο αδένωμα είναι πολύ πιθανό να εμφανιστεί κατά τη μετάπτωσή του σε καρκίνωμα, ενώ αν υπάρχει στο υπολειπόμενο αδένωμα θα παραμείνει και στο αντίστοιχο καρκίνωμα. Πρόκειται για αλλοίωση που ενώ δεν εμφανίζεται συχνά στα αδενώματα, είναι πολύ πιθανό να αποκτηθεί όταν μεταπέσουν σε

καρκίνωμα, υποδηλώνοντας τη σημασία του p53 στην εγκατάσταση του κακοήθους φαινοτύπου<sup>88</sup>.

### **Καρκινώματα:**

Ki-67/βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης:

Στην παρούσα μελέτη ο βαθμός θετικότητας του παράγοντα πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1 είναι ανάλογος με το βαθμό διαφοροποίησης ( $p < 0.005$ ). Δηλαδή, όσο χαμηλότερη είναι η διαφοροποίηση ενός αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των κυττάρων του που βρίσκεται σε φάση πολλαπλασιασμού και εκφράζει το δείκτη Ki-67/MIB1<sup>164</sup>. Το εύρημα αυτό δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία μέχρι τη δημοσίευση του άρθρου μας το 1997. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες σε καρκινώματα μαστού<sup>165</sup>, νεφρού<sup>141</sup>, λεμφώματα<sup>150</sup> και όγκους των οστών<sup>148</sup>.

Συνεπώς, η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του δείκτη Ki-67/MIB1 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου φαίνεται ότι μπορεί να βελτιώσει την ακρίβεια του υπολογισμού του βαθμού της ιστολογικής διαφοροποίησης σε σύγκριση με μεθόδους βασιζόμενες μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως έμμεσος δείκτης της βιολογικής επιθετικότητας των όγκων αυτών. Επιπρόσθετη μελέτη που θα συσχετίζει το δείκτη Ki-67/MIB1 με την πρόγνωση των ασθενών θα μπορούσε να καθορίσει τη χρησιμότητα του ως κλινικού προγνωστικού δείκτη στους ασθενείς που πάσχουν από αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου.

Bcl-2:

Η συσχέτιση της έκφρασης της bcl-2 με την ιστολογική διαφοροποίηση, το στάδιο κατά Dukes', τον παράγοντα πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1 και την έκφραση της p53 δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Αυτό πιθανώς συμβαίνει διότι, παρά το γεγονός ότι η p53 πρωτεΐνη ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του bcl-2, υπάρχουν κι' άλλοι παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του bcl-2 θετικά ή αρνητικά, δηλαδή, τα υπόλοιπα μέλη της αντιαποπτωτικής οικογένειας των bcl-2-σχετιζόμενων πρωτεϊνών<sup>166</sup>. Επιπλέον, η αναστολή της απόπτωσης δε σχετίζεται άμεσα με την επιθετικότητα του νεοπλάσματος αλλά με την επιμήκυνση του χρόνου ζωής

των κυττάρων, που θα δώσει το χρόνο για τη συσσώρευση μεταλλάξεων. Από τα ευρήματα προηγούμενων μελετών φαίνεται ότι η σχέση p53/bcl-2 είναι παράλληλη στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα του ρινοφάρυγγα<sup>167</sup> και αντίστροφη στα θυμώματα<sup>168</sup>, υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση p53/bcl-2 μπορεί να είναι εξαρτώμενη από τον τύπο του νεοπλάσματος.

p21<sup>waf1</sup>.

Έκφραση της p53 παρατηρήθηκε σε 64% (63/98) των καρκινωμάτων και στο 80% των p53 θετικών περιπτώσεων το ποσοστό της έκφρασης ήταν πάνω από 25% στα κύτταρα του όγκου. Αυτό αποτελεί ενδεικτικό στοιχείο ότι η αλλοίωση της p53 (μετάλλαξη ή αδρανοποίηση) παίζει σημαντικό ρόλο στη νεοπλασματική εξαλλαγή, καθώς σε κανένα από τα αδενώματα το ποσοστό της έκφρασης δεν υπερέβαινε το 25%, ενώ απουσίαζε στο φυσιολογικό βλεννογόνο. Επίσης είναι ένδειξη μετάλλαξης του p53 γονιδίου, καθώς υπάρχει σημαντική συσχέτιση (58-95%) μεταξύ ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της p53 (με κατώτερο όριο θετικότητας το 5-10%) και μετάλλαξης του p53 γονιδίου στα αδenoκαρκινώματα του παχέος εντέρου<sup>93,96,99</sup>.

Ως έμμεση προσέγγιση για την εκτίμηση της κατάστασης του p53 γονιδίου, μελετήθηκε η έκφραση της p21<sup>waf1</sup>, καθώς αποτελεί μία από τις πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση αυξάνεται μετά από ενεργοποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού από την wt-p53 (transcriptional activation function)<sup>116</sup>.

Η συσχέτιση της έκφρασης της p21 με την έκφραση της p53 υποδηλώνει ότι υπάρχει τάση για αντίστροφη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών<sup>169</sup>. Δηλαδή, όπου δεν εκφράζεται p53 υπάρχει τάση για έκφραση της p21. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p53 υποδηλώνει ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι μεταλλαγμένη ή αδρανοποιημένη, η έκφραση της p21 στις p53 θετικές περιπτώσεις (p53+/p21+) πιθανότατα επάγεται από μηχανισμούς ανεξάρτητους της p53, ενώ η έκφραση της p21 στις p53 αρνητικές περιπτώσεις (p53-/p21+) υποδηλώνει ότι πιθανότατα η p21 επάγεται από την p53 που λειτουργεί φυσιολογικά εφόσον δεν ανιχνεύεται. Εφόσον παρατηρείται στατιστικά σημαντική τάση έκφρασης της p21 στις p53 αρνητικές περιπτώσεις αυτό πιθανότατα υποδηλώνει ότι υπάρχει τάση

για p53-εξαρτώμενη επαγωγή της έκφρασης της p21 στα καρκινώματα του παχέος εντέρου.

Βέβαια, το γεγονός ότι οι περιοχές έκφρασης των δύο πρωτεϊνών στις p21+/p53+ περιπτώσεις συνήθως δε συμπίπτουν, ενισχύει την πιθανότητα υπερίσχυσης της p53-εξαρτώμενης επαγωγής της p21, εφόσον στις περιοχές που παρατηρείται έκφραση της p21 αυτή πιθανότατα οφείλεται στην επαγωγή από τη λειτουργική p53 που δεν ανιχνεύεται στις αντίστοιχες περιοχές. Αντίστροφα, η απουσία έκφρασης της p21 που παρατηρείται συνήθως στις περιοχές που εκφράζουν την p53 πιθανότατα οφείλεται στην αδυναμία των p53-ανεξάρτητων μηχανισμών να επάγουν την p21 όταν η p53 είναι αδρανοποιημένη. Όμως, υπάρχουν μερικές p21+/p53+ περιπτώσεις με αντιστοιχία στην έκφραση των δύο αυτών πρωτεϊνών, στις οποίες η p21 πιθανότατα επάγεται από p53-ανεξάρτητους μηχανισμούς εφόσον η p53 στις περιοχές αυτές είναι αδρανοποιημένη.

Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι και οι δύο μηχανισμοί επαγωγής της p21 πρωτεΐνης συμμετέχουν στα καρκινώματα του παχέος εντέρου.

Αναφορικά με την αρνητική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ p21<sup>waf1</sup> και σταδίου κατά Dukes' (πίνακας 1), φαίνεται ότι η επέκταση του όγκου οδηγεί σε προοδευτική αδυναμία επαγωγής της p21, δηλαδή σε προοδευτική απώλεια των κυτταρικών μηχανισμών αναστολής του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που βοηθά στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξή τους έναντι των φυσιολογικών κυττάρων.

#### P53/mdm2:

Τρία πρότυπα έκφρασης p53/mdm2 παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη<sup>169</sup>:

A. Σύγχρονη έκφραση: p53+/mdm2+, 50 περιπτώσεις.

Στο 82% αυτών των περιπτώσεων παρατηρείται υψηλό ποσοστό έκφρασης της p53 (>25%). Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι α) υψηλό ποσοστό έκφρασης της p53 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου συνήθως σχετίζεται με μεταλλαγμένη πρωτεΐνη<sup>93,96,99</sup> β) μετάλλαξη της p53 παρατηρείται σε ποσοστό 40-70% των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου και γ) οι περιοχές έκφρασης p53 και mdm2 συμπίπτουν στη μελέτη μας, το εύρημα της σύγχρονης έκφρασης p53/mdm2 ερμηνεύεται ως εξής:

είτε η mdm2 συνδέεται όχι μόνο με τη wild-type αλλά και με τη μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη, είτε υπάρχει συγχρόνως και το φυσιολογικό p53 αλληλόμορφο που επάγει την mdm2. Καθώς η σύνδεση της p53 με την mdm2 καταστέλλει τη δράση και προάγει την αποδόμηση της p53, είναι πιθανό ότι η mdm2 συμμετέχει στην παθογένεση αυτών των νεοπλασμάτων απορρυθμίζοντας την οδό καταστολής της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η θετική συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ mdm2 και σταδίου του όγκου (πίνακας 1) υποδηλώνει ότι η συμμετοχή της mdm2 στην καταστολή της λειτουργίας του p53 αυξάνεται κατά την προοδευτική επέκταση του όγκου, ενισχύοντας την παραπάνω άποψη.

Β. Έκφραση της p53 χωρίς σύγχρονη έκφραση της mdm2 (p53+/mdm2-, 13/98 περιπτώσεις). Σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι πιθανό ότι η μετάλλαξη της p53 είναι υπεύθυνη για την απορρύθμιση της φυσιολογικής οδού καταστολής της ανάπτυξης.

Γ. Απουσία έκφρασης p53 και mdm2 (p53-/mdm2-, 35/98 περιπτώσεις). Σ' αυτές τις περιπτώσεις είτε το p53 γονίδιο είναι φυσιολογικό και παράγει λειτουργική p53 πρωτεΐνη η οποία δεν επάγει την mdm2, είτε πρόκειται για απώλεια και των δύο p53 αλληλόμορφων και επομένως είναι αδύνατη η επαγωγή της mdm2.

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε έκφραση της mdm2 χωρίς σύγχρονη έκφραση της p53 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σε αδιαφοροποίητα καρκινώματα του ρινοφάρυγγα<sup>170</sup> και σε non-Hodgkin λεμφώματα<sup>171</sup>, αλλά διαφέρει από μελέτες σε καρκινώματα μαστού<sup>172</sup> και καρκινώματα από μεταβατικό επιθήλιο<sup>173</sup> όπου βρέθηκε χαμηλό ποσοστό ή απουσία έκφρασης της p53 στους όγκους που παρουσίαζαν έκφραση της mdm2. Αυτό υποδηλώνει ότι η σχέση p53/mdm2 είναι εξαρτώμενη από το είδος του νεοπλάσματος.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη η έκφραση p53 και mdm2 είναι παράλληλη, με υψηλό βαθμό στατιστικής σημαντικότητας ( $p < 0.001$ ). Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι η mdm2 επάγεται από την p53 αφού η δεύτερη σταθεροποιηθεί<sup>83</sup>.

Σχετικά με τη συνδυασμένη έκφραση p53/mdm2/p21 (πίνακας 3) παρατηρείται ότι όταν η mdm2 είναι αρνητική, η σχέση p53/p21 είναι

αντίστροφη ( $p < 0.005$ ), ενώ όταν η mdm2 είναι θετική, η έκφραση της p21 είναι ανεξάρτητη από την p53. Δηλαδή, στις mdm2-/p53- περιπτώσεις είναι πιθανό ότι η p53 πρωτεΐνη είναι λειτουργική και επάγει την p21 (p21+), ενώ στις mdm2-/p53+ περιπτώσεις είναι πιθανό ότι η p53 πρωτεΐνη είναι μεταλλαγμένη και δεν επάγει την p21 (p21-). Η συνδυασμένη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών δεν έχει μελετηθεί ως τη δημοσίευση του άρθρου μας<sup>169</sup> το 1997.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Ένα μεγάλο ποσοστό αδenoκαρκινωμάτων παχέος εντέρου (50/98) εκφράζει την p53 πρωτεΐνη σε ποσοστό πάνω από 25% των κακοηθών κυττάρων. Επίσης, αυτή η πρωτεΐνη δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό βλεννογόνο, δεν εκφράζεται σε αδενώματα με χαμηλού βαθμού δυσπλασία και εκφράζεται λίγο περισσότερο σε αδενώματα με σοβαρού βαθμού δυσπλασία. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν συμμετοχή της διαταραχής της έκφρασης του p53 σε όψιμα στάδια της γενετικής οδού ανάπτυξης του αδenoκαρκινώματος.

2. Ο προσδιορισμός του δείκτη Ki-67/MIB1 στα αδenoκαρκινώματα του παχέος εντέρου σχετίζεται σημαντικά με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης και φαίνεται ότι μπορεί να βελτιώσει την ακρίβεια του υπολογισμού του βαθμού της ιστολογικής διαφοροποίησης σε σύγκριση με μεθόδους βασιζόμενες μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά. Είναι πιθανό ότι η έκφραση του Ki-67 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως έμμεσος δείκτης της βιολογικής επιθετικότητας των όγκων αυτών.

3. Η έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης δεν παρουσιάζει συσχέτιση με το στάδιο κατά Dukes', την ιστολογική διαφοροποίηση, τον παράγοντα πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1 και την έκφραση της p53 πρωτεΐνης.

4. Η έκφραση της p21<sup>waf1</sup> πρωτεΐνης στα αδenoκαρκινώματα του παχέος εντέρου παρουσιάζει αντίστροφη σχέση με το στάδιο κατά Dukes' υποδηλώνοντας ότι η επέκταση του όγκου οδηγεί σε προοδευτική αδυναμία επαγωγής της p21, δηλαδή σε προοδευτική απώλεια των κυτταρικών μηχανισμών αναστολής του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που βοηθά στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξή τους έναντι των φυσιολογικών κυττάρων.

Η επαγωγή της p21<sup>waf1</sup> πρωτεΐνης στα εν λόγω καρκινώματα φαίνεται να είναι και p53-εξαρτώμενη και p53-ανεξάρτητη.

5. Η έκφραση της mdm2 πρωτεΐνης στα αδenoκαρκινώματα του παχέος εντέρου είναι παράλληλη με το στάδιο κατά Dukes' υποδηλώνοντας συμμετοχή της mdm2 στην προοδευτική επέκταση του όγκου.



Το ποσοστό της έκφρασης της mdm2 είναι παράλληλο με το ποσοστό της έκφρασης της p53. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι η mdm2 επάγεται από την p53 αφού η δεύτερη σταθεροποιηθεί.

6. Η σχέση των πρωτεϊνών p53/p21 σχετίζεται με την έκφραση της mdm2 πρωτεΐνης. Όταν η mdm2 δεν ανιχνεύεται, η σχέση p53/p21 είναι αντίστροφη ( $p < 0.005$ ), ενώ όταν η mdm2 ανιχνεύεται, η έκφραση της p21 είναι ανεξάρτητη από αυτήν της p53.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο p53 κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου διατηρώντας τη γενετική σταθερότητα. Το p53 δρα ως μοριακός διακόπτης που ενεργοποιεί μηχανισμό κυτταρικού ελέγχου πριν από τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S και έχει τη δυνατότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων στόχων που τα παράγωγά τους σχετίζονται με την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη δυνατότητα να επάγει κυτταρική απόπτωση.

Η παρούσα μελέτη εξετάζει την ανοσοϊστοχημική έκφραση των p53 επαγόμενων πρωτεϊνών p21<sup>waf1</sup> και mdm2 και της bcl-2 αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης σε σχέση με την έκφραση της p53, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1, το στάδιο κατά Dukes' και το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου ώστε να αποκτήσουμε συνδυασμένες πληροφορίες για τη συμμετοχή των εν λόγω πρωτεϊνών στη γενετική οδό της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου και να εκτιμήσουμε την κλινική τους αξία όσον αφορά στην πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των όγκων αυτών.

Το υλικό αποτελούν 98 αδενοκαρκινώματα και 11 αδενώματα παχέος εντέρου σε τομές από block παραφίνης. Έκφραση των p53, p21<sup>waf1</sup>, mdm2 και bcl-2 πρωτεϊνών παρατηρήθηκε σε 63/98, 72/98, 50/98 και 52/98 αδενοκαρκινώματα και σε 4/11, 10/11, 8/11 και 10/11 αδενώματα, αντίστοιχα.

Παρατηρήθηκε παράλληλη έκφραση μεταξύ των p53 και mdm2 πρωτεϊνών ( $p < 0.001$ ) και παράλληλη έκφραση της mdm2 πρωτεΐνης με το στάδιο κατά Dukes' ( $p < 0.05$ ), υποδηλώνοντας συμμετοχή της mdm2 στην προοδευτική επέκταση του όγκου. Μεταξύ των p53 και p21 πρωτεϊνών παρατηρήθηκε αντίστροφη έκφραση ( $p < 0.05$ ) υποδηλώνοντας ότι η επαγωγή της p21<sup>waf1</sup> πρωτεΐνης στα εν λόγω καρκινώματα φαίνεται να είναι και p53-εξαρτώμενη και p53-ανεξάρτητη, ενώ επίσης αντίστροφη είναι η σχέση μεταξύ έκφρασης της p21 και σταδίου κατά Dukes' ( $p < 0.05$ ), υποδηλώνοντας ότι η επέκταση του όγκου οδηγεί σε προοδευτική απώλεια των κυτταρικών μηχανισμών αναστολής του κυτταρικού κύκλου. Δεν

παρατηρήθηκε συσχέτιση της bcl-2 πρωτεΐνης με την p53, το δείκτη Ki-67/MIB1, το στάδιο και το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης.

Η έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 δεν παρουσιάζει συσχέτιση με την p53 ή την p21 πρωτεΐνη, συσχετίζεται όμως με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης ( $p < 0.005$ ). Το ποσοστό της έκφρασης του Ki-67 είναι υψηλότερο σε αδενοκαρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης. Συνεπώς, ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως έμμεσος δείκτης της βιολογικής επιθετικότητας των όγκων αυτών.

## SUMMARY

P53 gene has a central role in mammalian cell cycle control conserving genomic stability. P53 exerts its action mainly by transcriptional activation of target genes and apoptotic signals. The present study was undertaken to examine the distribution of p53 downstream effector proteins p21<sup>waf1</sup> and mdm2 and bcl-2 anti-apoptotic protein in human colorectal adenocarcinomas, in relation to p53 protein expression, proliferation nuclear antigen Ki-67/MIB1, Dukes' stage and histological grade in order to obtain combined information about the involvement of these proteins in the genetic pathway of colorectal tumorigenesis and to estimate possible clinical use in evaluating the biological behaviour of these tumours. immunophenotypes characterising these tumours.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from 98 colorectal adenocarcinomas and 11 adenomas were stained using immunohistochemical methods for the detection of these proteins. P53, p21<sup>waf1/cip1</sup>, mdm2 and bcl-2 proteins were expressed in 63/98, 72/98, 50/98 and 52/98 cases of adenocarcinomas and in 4/11, 10/11, 8/11 and 10/11 adenomas, respectively.

There was an extremely high correlation in parallel expression of p53 and mdm2 proteins in adenocarcinomas ( $p < 0,001$ ) and also proportionate relation between level of mdm2 expression and Dukes' stage ( $p < 0.05$ ), indicating involvement of mdm2 during progressive extension of the tumour. P21<sup>waf1</sup> level of expression was inversely related to p53 protein expression ( $p < 0,05$ ) in adenocarcinomas, indicating that both p53-dependent and p53-independent induction of p21<sup>waf1</sup> expression may be involved in the molecular mechanisms controlling these tumours. Moreover, p21<sup>waf1</sup> level of expression was inversely related to Dukes' stage ( $p < 0.05$ ), indicating that tumour extension leads to progressive loss of cell-cycle arrest mechanisms in colorectal adenocarcinomas. There was no correlation between bcl-2 expression and p53 expression, Ki-67/MIB1 expression, histological grade or Dukes' stage of adenocarcinomas. The above finding indicates that even p53 is

regarded as a downregulator of bcl-2 protein, there are also other factors regulating its expression as supported by the literature.

Ki-67/MIB1 expression was not correlated with p53 or p21<sup>waf1</sup> expression in adenocarcinomas, but only with tumour grade. Ki-67/MIB1 levels were higher in low grade tumours ( $p < 0,005$ ). Consequently, Ki-67/MIB1 could be a used as an indirect marker for predicting the biological aggressiveness of these tumours.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. The nature of cancer, in *Genes and the Biology of Cancer* by H. Varmus and R. A. Weinberg, ed. Scientific American Library 1993, ch 2.
2. Hamilton SR. The adenoma-adenocarcinoma sequence in the large bowel: variations on a theme. *J Cell Biochem* 1992; 16G(Suppl): 41-6.
3. Scott N, Quirke P. Molecular biology of colorectal neoplasia. *Gut* 1993;34:289-292.
4. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics, 1993. *CA Cancer J Clin* 1993;43:7.
5. Silverberg E, Boring CC, Squires TS: Cancer statistics 1990; *Ca* 40: 9.
6. Haenzel W, Kurihara M. Studies on Japanese immigrants. Mortality from cancers and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1968;40:43.
7. Thind IS, Najem R, Paradiso J et al. Cancer among blacks in Newark, New Jersey, 1970-1976. *Cancer* 1982;50:180.
8. Elmasri SH, Boulos PB. Carcinoma of the large bowel in Sudan. *Br J Surg* 1975;62:284.
9. Greenwald P. Colon cancer overview. *Cancer* 1992;70:2597.
10. Willet W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 1989;338:389.
11. Willet WC, Stamper MJ, Colditz GA, et al. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990;323:1664.
12. Craven PA, Pfanstiel J, De Rubertis FR. Role of reactive oxygen in bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. *J Clin Invest* 1986;77:850.
13. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971;28:3-13.
14. Malignant tumors of the colon, in *Textbook of Gastroenterology* by Tadataka Yamada, ed. Lippincot company Philadelphia 1995, ch 87.

15. 15A. Manousos O, Day NE, Trichopoulos D, Gerovassilis F, Tzonou A, Polychronopoulou A. Diet and colorectal cancer: a case-control study in Greece. *Int J Cancer* 1983;32:1-5.
- 15B. Trichopoulos D, Polychronopoulou A. Epidemiology, diet and colorectal cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:335-337.
16. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res* 1992;52:2085.
17. Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE et al. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 1993;53:1322.
18. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
19. Nystrom-Lahti M, Parsons R, Sistonen p, et al. Mismatch repair genes on chromosome 2p and 3p account for a major share on hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet* 1994;55:659-665.
20. Vasen HF, Mecklin J-P, Kahn PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-425.
21. Lovett E. Family studies in cancer of the colon and rectum. *Br J Surg* 1976;63:13.
22. St. John DJB, McDermott FT, Hopper JL, et al. Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1993;118:785.
23. Kee F, Wilson RH, Gilliland R, et al. Changing site distribution of colorectal cancer. *Br Med J* 1992;305:158.
24. Umpleby HC, Ranson DL, Williamson RCN. Peculiarities of mucinous colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1985;72:715.
25. Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1996;149(2):381-7.
26. Hamilton SR. The adenoma-adenocarcinoma sequence in the large bowel: variations on a theme. *J Cell Biochem* 1992;16G(Suppl):41-6.

27. Kozuka S, Nogaki M, Ozeki T et al. Premalignancy of the mucosal polyp in the large intestine: II. Estimation of the periods required for malignant transformation of mucosal polyps. *Dis Colon Rectum* 1975;18:494.
28. Carroll RLA, Klein M. How often should patients be sigmoidoscoped? A mathematical perspective. *Prev Med* 1980;9:741.
29. Mueller J, Mueller E, Hoepner I, Jutting J, Bethke B, Stolte M, Hofler H. Expression of bcl-2 and p53 in de novo and ex-adenoma colon carcinoma: a comparative immunohistochemical study. *J Path* 1996;180:259-265.
30. Newland RC, Chapuis PH, Fracs MT et al. The relation of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: a prospective study of 503 cases. *Cancer* 1981;47:1424.
31. Fisher ER, Sass R, Palecar A et al. Dukes' classification revisited. Findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects (protocol R-01). *Cancer* 1989;64:2354.
32. Mulcahy HE, O'Donoghue DP. Molecular biology. Setting the stage in colorectal cancer. *Gut* 1993;34:1476-1477.
33. Multistep Carcinogenesis in, *Genes and the Biology of Cancer* by H. Varmus and R. A. Weinberg, ed. Scientific American Library 1993, ch 7.
34. Clues to the origin of cancer in, *Genes and the Biology of Cancer* by H. Varmus and R. A. Weinberg, ed. Scientific American Library 1993, chapter 3, p44-65.
35. The genetic elements governing cancer: tumor suppressor genes, in *Genes and the Biology of Cancer* by H. Varmus and R. A. Weinberg, ed. Scientific American Library 1993, ch 5.
36. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-248.
37. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991;64:313-326.
38. Cohen J. Apoptosis. *Immunology today* 1993;14:126-130.
39. Mikulski SM. Pathogenesis of cancer in view of mutually opposing apoptotic and anti-apoptotic growth signals. *Int J Oncology* 1994;4:1257-1263.
40. Apoptosis and cancer by DR Green, RP Bissonnette and TG Cotter in, *Important Advances in Oncology* by VT DeVita, S Hellman and SA Rosenberg, ed. Lippincot Co, Philadelphia 1994, ch 3, p:37-51.



41. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 cdk-interacting protein Cip-1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-16.
42. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
43. Losi L, Roncucci L, Di Gregorio C, et al. K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 1996;178:259-63.
44. Michalovitz D, Halevy O, Oren M. P53 mutations: gains or losses? *J. Cell Biochem.* 1991;338:722-4.
45. Eshleman J.R, Markowitz S.D. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Current Opinion in Oncology* 1995;7:83-89.
46. Loeb L.A. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-5073.
47. Yuan Y, Han HJ, Zheng S, Park JG. Germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic early-onset colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998;41:434-440.
48. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton S.R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-156.
49. Ilyas M, Tomlinson I.P.M, Novelli M.R, Hanby A, Bodmer W.F, Talbot I.C. Clinico-pathological features and p53 expression in left-sided sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *J Pathol* 1996;179:370-375.
50. Ilyas M, Tomlinson I.P. Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology* 1996;28:389-399.
51. Tomlinson I, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, Bodmer W. A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. *J Pathol* 1998;184:148-152.
52. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol* 1941;200:47.

53. Fritz P, Wu X, Tuzcek H, Multhaupt H, Schwarzmann P. Quantitation in immunohistochemistry. A research method or a diagnostic tool in surgical pathology? *Pathologica* 1996;87:300-309.
54. Linzer DIH, Levine A. Characterization of a 54 Kdalton cellular SV-40 tumor antigen present in SV-40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;17:43-52.
55. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403-8.
56. Levine AJ. The role of p53 as a tumour suppressor in human cancers. *Advances in Oncology* 1992;8:3-9.
57. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-1146.
58. Vogelstein B. *Nature* 1990;348:681.
59. Varley JM, Brammar WJ, Lane DP, Swallow JE, Dolan C, Walker RA. Loss of chromosomes 17p13 sequences and mutation of p53 in human carcinomas. *Oncogene* 1991;6:413-421.
60. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B et al. Patterns of expression of the p53 tumor suppressor gene in human breast tissues and tumors in situ and in vitro. *Int J Cancer* 1990;46:839-844.
61. Gattoretto G, Rilke F, Andreola S, Amato L, Della D. P53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988;11:178-183.
62. Baker SJ, Fearon SR, Nigro JM. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221.
63. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. P53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991;138:807-813.
64. Sanidas EE, Filipe IM, Jader S, Linehan J, Dunn J, Levinson D. Immunohistochemical detection of the p53 gene product in gastric cancer patients: aberrant expression but no prognostic significance. *Onc Reports* 1994;1:1263-1268.
65. Hsu JC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutations hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991;350:427-428.

66. Fontanini G, Bigini D, Vignati S et al. P53 expression in non small cell lung cancer: clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1993;13(3):737-742.
67. Haapasalo H, Isola J, Sallinen P et al. Aberrant p53 expression in astrocytic neoplasms of the brain: association with proliferation. *Am J Pathol* 1991;142:1347-1351.
68. Stretch JR, Gatter KC, Lane DP, Harris AL. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 1991;51:5976-5979.
69. Stretch JR, Gatter KC, Lane DP, Harris AL. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 1991;51:5976-5979.
70. Niedobitek G, Rowlands D, Young LS et al. Overexpression of p53 in Hodgkin's disease: lack of correlation with Epstein-Barr virus infection. *J Pathol* 1993;169:207-212.
71. Ramqvist T, Magnusson KP, Wang V et al. Wild-type p53 induces apoptosis in a Burkitt lymphoma (BL) line that carries mutant p53. *Oncogene* 1993;8:1495-1500.
72. Orden G, Kiddie R, et al. Assesment of p53 protein expression in normal, benign and malignant oral mucosa. *J Pathl* 1992;166:389-394.
73. Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R et al. Mutations of p53 gene in lymphoid leukemia. *Blood* 1991;77:1153-1155.
74. Mashal R, Shtalrid M, Talpaz M, et al. Rearrangement and expression of p53 in the chronic phase and blastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1990;75:180-189.
75. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. P53 mutation in human cancer. *Science* 1991;253:49-53.
76. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour supressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
77. Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342:705-708.
78. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Nature* 1989;342:705.
79. Jacks T, Weinberg RA: Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 1996;381:643-644.

80. Smith ML, Chen I-T, Zhan Q, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of UV-type DNA damage. *Oncogene* 1995;10:1053-1059.
81. El-Deiry WS, J.W.Harper, P.M.O'Connor, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169-1174.
82. Hall PA, Meek D, Lane DP. P53-integrating the complexity. *J Path* 1996;180:1-5.
83. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998;95:5-8.
84. Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16.
85. Chen PL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990;250:1576-1580.
86. Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between genes encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984;312:649-651.
87. Eliyahu D, Michalovitz D, Oren M. Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* 1985;316:158-160.
88. Blondal JA, Benchimol S. The role of p53 in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 1994;5:177-186.
89. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-967.
90. Wynford-Thomas D. P53: guardian of cellular senescence. *J Path* 1996;180:118-121.
91. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England J Med* 1988;319:525-531.
92. Van Den Berg FM, Tigges AJ, Schipper MEI, Den Hartog-Jager FCA, Kroes WGM, Walboomers JMM. Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *J Path* 1989;157:193-199.
93. Costa A, Marasca R, Valentinis B, Savarino M, Faranda A, Silvestrini R, Torelli G. P53 gene point mutations in relation to p53 protein accumulation in colorectal cancers. *J Path* 1995;176:45-53.

94. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AKC, Coggi G. P53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1995;147:790-798.
95. Bertorelle R, Esposito G, Belluco C, Bonaldi L, Del Mistro A, Nitti D, Lise M, Chieco-Bianchi L. P53 gene alterations and protein accumulation in colorectal cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996;49:M85-M90.
96. Kastrinakis WV, Ramchurren N, Rieger KM, Hess DT, Loda M, Steele G, Summerhayes IC. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* 1995;11:647-652.
97. Hall PA, Lane DP. P53 in tumor pathology, Editorial in *Journal of Pathology* 1994; 172:1-4
98. Wu X, Boyle JH, Olson DC, Levine AJ. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993;7:1126-1132.
99. Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue DP, Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. *J Pathol* 1996;180:364-370.
100. Save V, Nylander K, Hall PA. Why is p53 protein stabilized in neoplasia? Some answers but many more questions! *J Pathol* 1998;184:348-350.
101. Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991;10:1565-1569.
102. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358:80-83.
103. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George DL, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237-1245.
104. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm-2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J* 1993;12:461-468.
105. Oliner JD, Pietenpol JA, Pietenpol S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B. MDM2 conceals the activation domain of p53. *Nature* 1993.

106. Piette J, Neel H, Morechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997;15:1001-1010.
107. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B. P53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993;53:2231-2234.
108. Sanchez-Beato M, Piris MA, Martinez-Montero JC, Garcia JF, Villuendas R, Garcia FJ, Orradre JL, Martinez P. MDM2 and p21 WAF1/CIP1, wild-type p53 induced proteins are regularly expressed by Sternberg-Reed cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 1996;180:58-64.
109. Gorgoulis VG, Zoumpourlis V, Rassidakis GZ, Karameris A, Rassidakis AN, Spandidos D, Kittas C. A molecular and immunohistochemical study of the MDM2 protein isoforms and p53 gene product in bronchogenic carcinoma. *J Pathol* 1996;180:129-137.
110. Waber PG, Chen J, Nisen DP. Infrequency of MDM2 gene amplification in pediatric solid tumors and lack of association with p53 mutation in adult squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:6028.
111. Kessis TD, Slebos RG, Han SM, Shah K, Bosch XF, Munoz N, Hedrick L, Cho KR. P53 gene mutations and mdm-2 amplification are uncommon in primary carcinomas of the uterine cervix. *Am J Pathol* 1993; 143:1398-405.
112. Ofner D, Maier H, Riedmann B, Holzberger P, Nogler M, Totsch M, Bankfalvi A, Winde G, Bocker W, Schmid KW. Immunohistochemically detectable p53 and mdm-2 oncoprotein expression in colorectal carcinoma: prognostic significance. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995;48:M12-M16.
113. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-555.
114. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266:1821-1828.
115. El-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Topological control of p21(Waf 1/Cip 1) expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995;55:2910-2919.
116. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF-1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993,75:817-825.

117. Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawis A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ. P53-independent expression of p21<sup>cip1</sup> in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995;267:1024-1027.
118. Noda A, et al. *Exp Cell Res* 1994;211:90-98.
119. Guinee D, Fleming M, Hayashi T, Woodward M, Zhang J, Walls J, Koss M, Ferrans V, Travis W. Association of p53 and WAF1 expression with apoptosis in diffuse alveolar damage. *Am J Path* 1996;149:531-538.
120. Tron VA, Tang L, Yong P, Trotter MJ. Differentiation-associated overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>WAF1</sup> in human cutaneous squamous cell carcinoma. *Am J Path* 1996;149:1139-1145.
121. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235-237.
122. Doglioni C, Pelosio P, Laurino L, Macri E, Meggiolaro E, Favretti F, Barbareschi M. P21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relation with differentiation. *J Path* 1996;179:248-253.
123. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-1443.
124. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80:879-886.
125. Kernohan NM, Cox LS. Regulation of apoptosis by bcl-2 and its related proteins: immunochemical challenges and therapeutic implications. *J Path* 1996;179:1-3.
126. Hockenbery DM, Oltval ZN, Yin XM, Millian CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions as an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.
127. Strasser A, Harris AW, Jacks T. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by bcl-2. *Cell* 1994;79:329-339.
128. Mc Donnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14:18). *Nature* 1991;349:254-256.

129. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-442.
130. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B-cells from programmed cell death. *Cell* 1991;65:1107-1115.
131. Wyllie AH. Death gets a brake. *Nature* 1994;369:272-273.
132. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Hoffman B, Liebermann DA, Reed JC. Tumour suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805.
133. Guillouf C, Grana X, Selvakumaran M, De Luca A, Giordano A, Hoffman B, Liebermann DA. Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest. *Blood* 1995;85:2691-2698.
134. Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologists? *Histopathology* 1995;26:89-93.
135. Flohil CC, Janssen PA, Bosman FT. Expression of bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas and carcinomas of the colon. *J Path* 1996;178:393-397.
136. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-6965.
137. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Path* 1995;146:21-26.
138. Kaklamanis L, Savage A, Mortensen N, Tsiotos P, Doussis-Anagnostopoulou I, Biddolph S, Whitehouse R, Harris AL, Gatter KC. Early expression of bcl-2 protein in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal neoplasia. *J Path* 1996;179:10-14.
139. Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AKC, Murray JJ, Coggi G, Viale G. Bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas and adenocarcinomas. *Hum Path* 1995;26:534-540.



140. Scott N, Martin I, Jack AS, Dixon MF, Quirke P. Genes mediating programmed cell death: an immunohistochemical study of bcl-2, c-myc and p53 expression in colorectal neoplasia. *J Clin Path: Mol Path* 1996;49:M151-M158.
141. Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RG, Kuhn R, Wittekind CW. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. *Cancer* 1996;77:164-171.
142. Miller PT, Grogan TM, Dahlberg S, Spier C, Braziel R, Banks P, Foucar K, Kjeldsberg C, Levy N, Nathwani B, Schnitzer B, Tubbs R, Gaynor E, Fisher R. Prognostic significance of the Ki-67-Associated Proliferative Antigen in aggressive Non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994;83(6):1460-1466.
143. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.
144. Sasaki K, Murakami R, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987;133:579-584.
145. Gattoretto G, Becker MHG, Key G et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detecting proliferating cells in microwave processed formalin fixed tissues. *J Pathol* 1992;168:357-364.
146. Franklin WA, Mc Donald GB, Stein HO et al. Immunohistologic demonstration of abnormal colonic cell kinetics in ulcerative colitis. *Hum Pathol* 1985;16:1129-1132.
147. Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, Van-Marck E, Goovaerts G, Huyghe M, De Bruijn EA, Van-Oosterom AT, Dirix LY. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumour cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol* 1995;6:59-64.
148. Scotlandi K, Serra M, Manarel MC, Maurici D, Benini S, Nini G, Campanacci M, Baldini N. Clinical relevance of Ki-67 expression in bone tumours. *Cancer* 1995;75:806-814.

149. Nakamura S, Akazawa K, Yao T, Tsuneyoshi M. A clinicopathologic study of 233 cases of primary gastric lymphomas with special reference to evaluation with the MIB-1 index. *Cancer* 1995;76:1313-1324.
150. Kalogeraki A, Tzardi M, Panagiotides I, Koutsoubi K, Bolioti S, Rontogianni D, Stefanaki K, Zois E, Karidi E, Darivianaki K, Delides G, Kanavaros P. MIB-1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res* 1997;17:487-492.
151. Kojima K, Naruo S, Kanayama H, Kagawa S. Evaluation of Ki-67 antigen using MIB1 antibody as a prognostic factor in renal pelvic and ureteral cancers. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1996;87:822-830.
152. Weiss L, Strickler J, Medeiros LJ, Gerdes L, Stein H, Warnke R. Proliferative rates of Non-Hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. *Hum Pathol* 1987;18:1155-1159.
153. Yang WI, Efir JT, Quintanilla-Martinez L, Choi N, Harris NL. Cell kinetic study of thymic epithelial tumors using PCNA (PC10) and Ki-67 (MIB1) antibodies. *Hum Pathol* 1996;27:70-76.
154. Choong PF, Akerman M, Willen H, Anderson C, Gustafson P, Baldetorp B, Ferno M, Alvegard T, Rydholm A. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in soft tissue sarcoma. Is prognostic significance Histotype-specific? *APMIS* 1995;103:797-805.
155. Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Beck T, Knapstein PG. Growth fractions (KI-67) in primary breast cancers, with particular reference to node-negative tumours. *Cancer Detect Prev* 1995;19:446-450.
156. Heegaard S, Sommer HM, Broholm H, Broendstrup O. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry of oligodendrogliomas with special reference to prognosis. *Cancer* 1995;76:1809-1813.
157. Youssef EM, Matsuda T, Takada N, Osugi H, Higashino M, Kinoshita H, Watanabe T, Katsura Y, Wanibuchi H, Fukushima S. Prognostic significance of the MIB-1 proliferation index for patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1995;76:358-366.
158. Geisler JP, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Geisler HE. Proliferation index determined by MIB-1 and recurrence in endometrial cancer. *Gynecol-Oncol* 1996;61:373-377.

159. Victorzon M, Roberts PJ, Haglund C, von-Boguslawsky K, Nording S. Ki-67 immunoreactivity, ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in patients with gastric carcinoma. *Oncology* 1996;53:182-191.
160. Van Noorden S. Tissue preparation and immunostaining techniques for light microscopy. In: Polak JM, Van Noorden S, eds. *Immunohistochemistry. Modern Methods and Applications*. 2nd edn. Bristol: Wright, 1986; 45-48.
161. Bruner JM, Connelly JH, Saya H. P53 protein immunostaining in routinely processed paraffin-embedded sections. *Modern Pathology* 1993;6:189-194.
162. Agresti A. *Categorical data analysis*, ed. Wiley, New York 1990. Edwards D. *Introduction to graphical modelling*, ed. Springer-Verlag, New York 1995.
163. Arai T, Kino I. Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J Pathol* 1995;176:37-44.
164. Valassiadou K, Stefanaki K, Vlahonikolis I, Sanidas E, Tsiftsis DD, Melissas I, Georgoulas V, Kakolyris S, Delides G, Kanavaros P. Immunohistochemical expression of MIB1(Ki-67) protein in colorectal adenocarcinomas. *Electronic Journal of Pathology and Histology*, 1997;3.2:972-03.txt
165. Ellis PA, Makris A, Burton SA, Titley J, Ormenod MG, Salter J, Powles TG, Smith IE, Dowsett M. Comparison of MIB-1 proliferation index with S-phase fraction in human breast carcinomas. *Br J Cancer* 1996;73:640-643.
166. Reed JC. Double identity for proteins of the bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-776.
167. Kouvidou C, Kanavaros P, Papaioannou D, Stathopoulos E, Sotsiou F, Datsaris G, Tzardi M, Kittas C, Delides G. Expression of bcl-2 and p53 proteins in nasopharyngeal carcinomas. Absence of correlation with the presence of EBV encoded EBER1-2 transcripts and latent membrane protein-1. *J Clin Pathol (Mol Pathol)* 1995;48:M17-M22.
168. Stefanaki K, et al. Immunohistochemical expression of bcl-2, p53, mdm2 and p21/waf1 proteins in thymomas. *Histopathology* 1997;30:549-555.
169. Valassiadou K, Stefanaki K, Tzardi M, Datsaris G, Georgoulas V, Melissas J, Tsiftsis DD, Delides G, Kanavaros P. Immunohistochemical expression of p53, bcl-2, mdm2 and waf1/p21 proteins in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Research* 1997;17:2571-2576.

170. Kanavaros P, Kouvidou Ch, Ran DY, Tzardi M, Datseris G, Darivianaki K, Rondogianni D, Delides G: MDM-2 protein expression in nasopharyngeal carcinomas. Comparative study with p53 protein expression. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995;48:M322-M325.
171. Tzardi M, Kouvidou Ch, Panayotides I, Stefanaki K, Rontogianni D, Zois E, Koutsoumbi K, Eliopoulos G, Delides G, Kanavaros P: P53 protein expression in non-Hodgkin lymphomas (NHL). Comparative study with the wild-type p53-induced proteins mdm-2 and p21/waf1. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996;49:M1-M5.
172. McCann AH, Kirley A, Carney DN, Carbally N, Magee HM, Keating G, Detvan PA: Amplification of the mdm-2 gene in human breast cancer and its association with mdm-2 and p53 protein status. *Br J Cancer* 1995;71:981-985.
173. Barbareschi M, Girlando S, Fellin G, Graffer U, Luciani L, Palma PD: Expression of mdm-2 and p53 protein in transitional cell carcinoma. *Urol Res* 1995;22:349-352.