**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ-
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΕΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ -
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΚΑΛΟΦΩΝΟΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΠΕΤΡΟΣ Δ. ΓΡΙΒΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΤΡΑ 2008

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ-
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΕΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ -
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΚΑΛΟΦΩΝΟΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΠΕΤΡΟΣ Δ. ΓΡΙΒΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΤΡΑ 2008

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χαράλαμπος Καλόφωνος

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας
Επιβλέπων Καθηγητής

Γεωργία Σωτηροπούλου-Μπονίκου

Αναπ. Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου

Καθηγητής Βιοχημείας
Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χαράλαμπος Καλόφωνος

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας
Επιβλέπων Καθηγητής

Γεωργία Σωτηροπούλου-Μπονίκου

Αναπ. Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου

Καθηγητής Βιοχημείας
Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Φώτης Καλφαρέτζος

Καθηγητής Χειρουργικής
Μέλος επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Αγλαΐα Αθανασιάδου

Καθηγήτρια Βιολογίας
Μέλος επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Μιχάλης Σταυρόπουλος

Καθηγητής Χειρουργικής
Μέλος επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Ελένη Κουρέα

Λέκτορας Παθολογικής Ανατομικής
Μέλος επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής και Κλινικής Ογκολογίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στις Κλινικές-Κλινικοεργαστηριακές Ιατρικές Ειδικότητες, κατά το χρονικό διάστημα 2005-2008. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της αλλά και στη γενικότερη ερευνητική μου δραστηριότητα.

Στο δάσκαλο και επιβλέποντα Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Καλόφωνο εκφράζω την αναγνώριση για τη συνεχή του υποστήριξη και ενεργό συμπαράσταση σε όλες μου τις προσπάθειες. Πραγματικά, θεωρώ την άψογη συνεργασία μας ουσιαστικό αρωγό του αγώνα μου και πρότυπο διαπροσωπικής και επαγγελματικής σχέσης.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Αναπ. Καθηγήτρια κ. Γεωργία Σωτηροπούλου-Μπονίκου για την αμέριστη βοήθεια και διαρκή συμβουλή σε δύσκολες περιόδους, συντελώντας σημαντικά στην επίλυση προβλημάτων.

Ιδιαίτερα πολύτιμη είναι και η συνεργασία μου με τον Καθηγητή κ.Αθανάσιο Γ. Παπαβασιλείου για την ουσιαστική καθοδήγηση, γνώση και «κουλτούρα» που μου προσέφερε καθώς και τη συνεχή συμβολή του.

Επίσης, σημαντικότετος παράγοντας στην υλοποίηση της όλης ερευνητικής μου δραστηριότητας είναι η συνεργασία μου με την κ. Άννα Αντωνακοπούλου με την πολύτιμη καθοδήγηση της οποίας ξεπεράστηκαν ποικίλα εμπόδια, ενώ με δίδαξε σημαντικές εργαστηριακές τεχνικές.

Επίσης, η αγαστή συνεργασία με την κ. Βασιλική Τζελέπη και την κ. Ζηνοβία Κεφαλοπούλου ήταν κομβικός παράγοντας ιδιαίτερα στις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας.

Τέλος, να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ-ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	9
ΑΝΑΤΟΜΙΑ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ-ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	11
ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	19
ΚΑΛΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ	20
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	21
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ/ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	25
ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ	28
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	31
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ	32
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	33
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	37
ΠΡΟΛΗΨΗ	38
ΘΕΡΑΠΕΙΑ	42
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	45
HUMAN EPIDERMAL RECEPTOR-3 (HER-3)	48
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ (ER) α/β	51
COREGULATORS OF TRANSCRIPTION	55
AMPLIFIED IN BREAST CANCER-1 (AIB-1)	55
PELP1/MNAR	57
TRANSCRIPTIONAL INTERMEDIARY FACTOR-2 (TIF-2)	59
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	61
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	86
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	125
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	149
SUMMARY	155
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	171

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί στο δυτικό κόσμο το δεύτερο συχνότερα διαγνώσιμο κακόηθες νεόπλασμα μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και τον τρίτο επιμέρους συχνότερο στους άνδρες και στις γυναίκες. Συνιστά το δεύτερο αίτιο ειδικής θνησιμότητας σχετιζόμενης με κακοήθεια και δημιουργεί τεράστιο κόστος για πολλά συστήματα υγείας παγκοσμίως. Η επίπτωση της νόσου ποικίλλει σε διάφορα κράτη, αντικατοπτρίζοντας διαφορετικές περιβαλλοντικές επιδράσεις καθώς και γενετικές προδιαθέσεις. Η παθογένεια του αποτελεί αντικείμενο ενδελεχούς μελέτης, ενώ ιδιαίτερη σημασία δίνεται στην προσπάθεια για πρόληψη, πρώιμη διάγνωση, εύρεση αντιπροσωπευτικών προγνωστικών βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων. Σκοπός είναι η μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας της νόσου και η βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Η πολυσταδιακή φύση της καρκινογένεσης αναδεικνύει τη σημασία συγκεκριμένων ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων, γονιδίων που ρυθμίζουν την απόπτωση καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες γενετικής επιδιόρθωσης στην παθογένεια της κακοήθους νεοπλασματικής νόσου. Συγκεκριμένα στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η υπερέκφραση ογκογονιδίων, όπως οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, σχετίζεται με υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αποδιαφοροποίηση, ελαττωμένη ικανότητα για απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), ανάπτυξη μηχανισμών νεοαγγειογένεσης, διήθησης και μετάστασης. Πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν το ρόλο που διαδραματίζουν τέτοιες πρωτείνες, όπως ο Human Epidermal Receptor-1 (HER-1/EGFR) στο αδenoκαρκίνωμα παχέος εντέρου, επιτείνοντας το ενδιαφέρον στη διεκρίνηση του ρόλου γειτονικών υποδοχέων, όπως του Human Epidermal Receptor-3 (HER-3). Ο HER-3 αποτελεί μεμβρανικό υποδοχέα, που

ενεργοποιεί μονοπάτια ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Επομένως, ποσοτικές μεταβολές στην έκφρασή του αλλά και ποιοτικές αλλαγές στη δομή του, συντελούν δυνητικά στην κυτταρική εξαλλαγή. Η σύνδεση προσδετών οδηγεί στην ενεργοποίησή του, προκαλώντας μοριακές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση καταλοίπων αμινοξέων), με συνέπεια την έναρξη μεταγωγικών διαδικασιών που καταλήγουν σε μεταβολές στο ρυθμό έκφρασης γονιδίων στον πυρήνα. Τα δεδομένα από τη μελέτη του HER-3 στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου είναι περιορισμένα και ο ρόλος του στην παθογένεια, πρόγνωση και θεραπεία της νόσου παραμένει ασαφής.

Αντίστοιχα με τους μεμβρανικούς υποδοχείς, πυρηνικοί υποδοχείς ενέχονται σε διαδικασίες ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης τροποποιώντας πιο άμεσα την κυτταρική σύσταση. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς [estrogen receptors (ER)] α και β θεωρούνται κομβικά μόρια, τα οποία διαμεσολαβούν την επίδραση των οιστρογόνων σε κυτταρικό επίπεδο, μεταφράζοντας τα επίπεδα των ορμονών σε μεταβολές γονιδιακής έκφρασης. Ο μαστός και το ενδομήτριο είναι κατ' εξοχήν οιστρογόνο-εξαρτώμενοι ιστοί, εμπλεκόμενοι στην παθογένεια ορμονοεξαρτώμενων κακοηθειών. Πρόσφατα δεδομένα επεκτείνουν τη σημασία αυτών των υποδοχέων και σε άλλους ιστούς, όπως στον πνεύμονα και το παχύ έντερο. Επίσης, διαφορές στην επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου στα δύο φύλα υπογραμμίζουν το ρόλο που ενδεχομένως διαδραματίζουν οι ορμονικοί υποδοχείς. Η ειδικότητα της οιστρογονικής δράσης σε επίπεδο ιστού και κυττάρου εξασφαλίζεται μέσω της δράσης συγκεκριμένων συμπαραγόντων (ενεργοποιητών/καταστολέων-coregulators of transcription). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι συνδεόμενοι με τους οιστρογονικούς αλλά και άλλους υποδοχείς «εξατομικεύουν» την ορμονική επίδραση στο γονιδίωμα. Τέτοια

κομβικά μακρομόρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην «ολοκλήρωση» ενδοκυττάρων μηνυμάτων, διεκπαιρώνοντας συγκεκριμένες μοριακές εντολές. Ο proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein 1 (PELP1), γνωστός και ως modulator of non-genomic activity of ER (MNAR), ο amplified in breast cancer-1 (AIB-1) και ο transcriptional intermediary factor-2 (TIF-2) είναι σημαντικοί συμπαράγοντες πυρηνικών υποδοχέων, με συνέπεια η μελέτη τους να αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της διερεύνησης των οιστρογόνο-εξαρτώμενων μηχανισμών. Η συνεχής αλληλεπίδραση (cross-talk) HER- και ER- εξαρτώμενων μονοπατιών έχει περιγραφεί σε ποικίλλους ιστούς.

Σκοπό της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου της (υπερ)έκφρασης του γονιδίου και της πρωτεΐνης HER-3 (φωσφορυλιωμένης και μη φωσφορυλιωμένης μορφής), των πρωτεϊνών του οιστρογονικών υποδοχέων (ER) και των συμπαράγοντων PELP1/MNAR, AIB-1 και TIF-2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η κυτταρική εντόπιση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στο φυσιολογικό βλεννογόνο, στα αδενώματα και στα αδеноκαρκινώματα καθώς και οι πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασής τους και σε ποικίλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου. Επίσης, μελετάται η πιθανή προγνωστική σημασία των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων βιοδεικτών σε ό,τι αφορά στο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου καθώς και τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Τέλος, διερευνάται η παρουσία συσχετίσεων ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των βιοδεικτών στα αδеноκαρκινώματα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η εμβρυική ανάπτυξη του γαστρεντερικού συστήματος χαρακτηρίζεται από 4 στάδια: 1. Δημιουργία αρχέγονου σωλήνα, 2. Εξειδίκευση των επιμέρους περιοχών (regional specification), 3. Μορφογένεση, 4. Διαφοροποίηση. Η τοπογραφική ανάπτυξη του συστήματος πραγματοποιείται σε 4 άξονες, κεφαλο-ουραίο, κοιλιακό-ραχιαίο, δεξιό-αριστερό και αργότερα ακτινικό (radial). Η διαδικασία αναγέννησης του συστήματος βασίζεται στη δυνατότητα αύξησης και αναγέννησης κατά τον ακτινικό άξονα. Τα μοριακά αναπτυξιακά γεγονότα που ενέχονται στην οργανογένεση του εντέρου είναι πολυδιάστατα και περιλαμβάνουν τη συντονισμένη δράση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων. Τέτοιοι παράγοντες κωδικοποιούνται από ομοιοτικά γονίδια (homeobox genes/Hox), τα οποία συμμετέχουν στην τοπογραφική διαφοροποίηση κατά τον κεφαλο-ουραίο άξονα, καθώς και από παρα-ομοιοτικά γονίδια που συμμετέχουν σε διαδικασίες μορφογένεσης [1]. Δείγμα της «απαρτιωτικής» φύσης της οργανογένεσης είναι η σημασία της αλληλεπίδρασης ενδοδέρματος–μεσοδέρματος, των συστατικών του εντέρου. Για παράδειγμα, ο παράγοντας Sonic hedgehog παραγόμενος από το ενδόδερμα επάγει τη διαφοροποίηση του λείου μυϊκού ιστού, ενώ αντίστοιχα σήματα από το μεσόδερμα ρυθμίζουν την αξονική διαφοροποίηση του ενδοδερμικού στοιχείου [2].

Το παχύ έντερο ανήκει στο μέσο (midgut) και οπίσθιο έντερο (hindgut) και η αιμάτωσή του προέρχεται από αντίστοιχες αρτηρίες του οπίσθιου εντέρου. Η πολυδιάστατη αλληλεπίδραση μεταγραφικών παραγόντων (Hox) ευρισκόμενων σε αρχέγονα ενδοδερμικά κύτταρα σε συνδυασμό με δυναμικές διαντιδράσεις επιθηλίου-μεσεγχύματος ρυθμίζουν τη διαδικασία της οργανογένεσης του παχέος εντέρου. Την

όγδοη εμβρυική εβδομάδα χαρακτηρίζει η εμφάνιση ενός αδιαφοροποίητου πολύστοιβου επιθηλίου, το οποίο αναπτύσσει λάχνες και κρύπτες (12-14^η εβδομάδα), για να αποκτήσει την τελική του δομή περίπου την 30^η εβδομάδα.

ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ

Η ομοιόσταση του επιθηλίου και η αποκατάσταση ιστικών βλαβών εξασφαλίζεται από τη δυνατότητα συνεχούς αναγέννησης του ιστού. Η απόπτωση των ώριμων κυττάρων ακολουθείται από αντικατάσταση από νέα κύτταρα προερχόμενα από τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων (stem κύτταρα), που βρίσκονται στη βάση των εντερικών κρυπτών (4-6 ανά κρύπτη). Τα stem κύτταρα παράγουν πιο διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν «μεταβατικά κύτταρα (transit amplifying)», που μεταναστεύουν προς τον αυλό διαφοροποιούμενα σταδιακά σε πιο ώριμα κύτταρα [3]. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περίπου πέντε μέρες και στηρίζεται στην αλληλεπίδραση ενδογενών (γενετικών) και εξωγενών (στρώμα, ορμόνες, κυτοκίνες, διάμεση ουσία) παραγόντων [4,5]. Η διακυτταρική «συνομιλία» μέσω ιντεγκρινών και άλλων μορίων πρόσφυσης επιφέρει μεταβολές σε στοιχεία κυτταροσκελετού, απαραίτητα για την κυτταρική μετανάστευση/κίνηση. Το μικροπεριβάλλον των επιθηλιακών κυττάρων έχει ιδιαίτερη σημασία με τους διαλυτούς παράγοντες που εκκρίνει καθώς και με τη συγκέντρωση γλυκοπρωτεϊνών, συστατικών που επιδρούν στη διαφοροποίηση των stem κυττάρων. «Ανισορροπία» των μηχανισμών αυτών οδηγούν σε εκτροπή της ομοιοστασίας των αρχέγονων κυττάρων, ενδεχομένως συμβάλλοντας στην ανάπτυξη κακοήθους εξαλλαγής [6]. Τα ποικίλλα επίπεδα έκφρασης ειδικών παραγόντων στα διάφορα είδη κυττάρων συντελούν στη συντονισμένη ρύθμιση διαδικασιών αναγέννησης, ενώ η απορύθμιση της

έκφρασής τους συμμετέχει σε μηχανισμούς καρκινογένεσης. Το γεγονός ότι ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχουν ιδιότητες stem κυττάρων υπογραμμίζει τη σημασία τέτοιας υπόθεσης [7]. Η ανάδειξη μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες έχει άμεσο αντίκτυπο στην κατανόηση των διεργασιών καρκινογένεσης.

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ-ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το παχύ έντερο αποτελεί τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα και εκτείνεται από το τέλος του ειλεού έως τον πρωκτό. Έχει συνολικό μήκος 1.5 μέτρα και υποδιαιρείται στο τυφλό, ανιόν, εγκάρσιο, κατión, σιγμοειδές, ορθό και πρωκτικό σωλήνα (εικόνες 1-4). Η διάμετρος είναι μεγαλύτερη στο τυφλό, και σταδιακά μειώνεται προς το ορθό, όπου παρουσιάζει μικρού βαθμού διάταση πριν τον πρωκτικό σωλήνα. Διαφέρει από το λεπτό έντερο ως προς τη μεγαλύτερη διάμετρο, την πιο καθηλωμένη θέση, τη σακοειδή μορφή, και την παρουσία των επιπλοικών αποφύσεων στον εξωτερικό χιτώνα του. Επίσης, οι επιμήκεις μυικές ίνες δε σχηματίζουν μια συνεχή στοιβάδα γύρω από τον αυλό, αλλά κατανέμονται σε επιμήκεις δομές, τις κολικές ταινίες, εκτός από το τμήμα που αντιστοιχεί στη σκωληκοειδή απόφυση [8]. Οι βασικές λειτουργίες του παχέος εντέρου είναι η απορρόφηση ύδατος και ηλεκτρολυτών, με στόχο τη μετατροπή του υδαρούς άπεπτου εντερικού περιεχομένου σε ημίρρευστη κοπρανώδη μάζα, η παραγωγή βλέννας, η οποία αυξάνει την ολισθηρότητα της ενδοαυλικής επιφάνειας και διευκολύνει τη διέλευση του περιεχομένου [9]. Επίσης, το παχύ έντερο διαδραματίζει ιδιαίτερα περιορισμένο ρόλο στην πέψη και αξιοποίηση θρεπτικών ουσιών, με τη συμμετοχή της εντερικής χλωρίδας. Ως αποτέλεσμα, ακόμα και σε κατάσταση κορεσμού, η κινητικότητα του παχέος εντέρου δεν είναι ενιαία με εκείνη του υπόλοιπου

γαστρεντερικού σωλήνα, αλλά παρουσιάζει μεμονωμένες, περιοδικές, προωθητικές συσπάσεις, με στόχο τη μεταφορά του περιεχομένου στον πρωκτικό σωλήνα.

Επιπλέον, οι αμυντικές λειτουργίες του παχέος εντέρου προϋποθέτουν την παρουσία καλά εξειδικευμένου ανοσοποιητικού συστήματος, που περιλαμβάνει ένα βλεννογόνο λεμφικό σύστημα (mucosa-associated lymphoid tissues-MALT) καθώς και συνιστώσες φυσικής ανοσίας, όπως μακροφάγα κύτταρα. Ο βλεννογόνος δρα ως ανατομικός και λειτουργικός φραγμός, ο οποίος εμποδίζει την επιζήμια μετατόπιση βακτηρίων προς τον οργανισμό. Ωστόσο, η ομοιόσταση της εντερικής χλωρίδας είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για διαδικασίες απορρόφησης, όπως κατά τον κύκλο των χολικών οξέων, όσο και για την παραγωγή σημαντικών ουσιών, όπως η βιταμίνη Κ.

Το τοίχωμα του παχέος εντέρου αποτελείται, κατά αντιστοιχία με τον υπόλοιπο γαστρεντερικό σωλήνα, από τέσσερις στοιβάδες: βλεννογόνο, υποβλεννογόνο, μυϊκό και ορογόνο (εικόνες 3-6). Ο βλεννογόνος στο τυφλό και στο κόλον, είναι ωχρός, λείος, χωρίς λάχνες, και σχηματίζει πολυάριθμες μηνοειδείς πτυχές. Στο ορθό είναι παχύτερος, πιο βαθυχρωματικός, με μεγαλύτερη αγγείωση και χαλαρά συνδεδεμένος με τη μυϊκή στοιβάδα, όπως στον οισοφάγο [8]. Αποτελείται από επιθήλιο, χόριο και βλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα, η οποία χωρίζει το βλεννογόνο από την υποβλεννογόνια στοιβάδα.

Το επιθήλιο είναι κυλινδρικό και αποτελείται από τους εξής τύπους κυττάρων (εικόνες 7,8):

- α) Καλυκοειδή-βλεννώδη κύτταρα: υπεύθυνα για την παραγωγή βλέννας, περιέχουν μεγάλα βλεννώδη κυστίδια.
- β) Κυλινδρικά-απορροφητικά κύτταρα: στενά κυλινδρικά στην κορυφαία μεμβράνη.

γ) Πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα (stem κύτταρα): αδιαφοροποιήτα με δυνατότητα αναγέννησης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε πιο ειδικά επιθηλιακά κύτταρα, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και αποκατάσταση ιστικής βλάβης και εντοπίζονται στο βάθος κρύπτης.

δ) Εντεροενδοκρινή: διάσπαρτα ανάμεσα στα υπόλοιπα είδη κυττάρων, λίγα σε αριθμό, περιέχουν κοκκία στη βάση του κυτταροπλάσματος κάτω από τον πυρήνα με διάφορες ουσίες, όπως ουσία P, γλυκαγόνη, σωματοστατίνη, χρωμογρανίνη.

Το επιθήλιο επικάθεται σε συνεχή στοιβάδα εξειδικευμένης μεσοκυττάριας ουσίας, τη βασική μεμβράνη, η οποία το διαχωρίζει από το υποκείμενο χόριο (εικόνα 5). Η βασική μεμβράνη συνίσταται από ειδικά για αυτή στοιχεία, όπως κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες, αλλά και συστατικά του στρώματος, όπως ινωδονεκτίνη και τενασίνη. Η σύστασή της επομένως, εξαρτάται τόσο από το επιθήλιο όσο και από το χόριο. Το χόριο αποτελείται από κύτταρα συνδετικού ιστού, όπως ινοβλάστες, και από μεσοκυττάρια ουσία. Περιέχει ποικιλία κυττάρων, όπως μακροφάγα, μυοινοβλάστες (κύτταρα με χαρακτηριστικά ινοβλάστη και λείων μυικών κυττάρων), λεμφοκύτταρα, λεμφοζίδια, αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα. Η βλεννογόνια μυική στοιβάδα αποτελείται από μια έσω κυκλωτερή και μια έξω επιμήκη στοιβάδα λείων μυικών κυττάρων [8, 10].

Ο υποβλεννογόνιος αποτελείται από συνδετικό ιστό με αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία και το υποβλεννογόνιο νευρικό πλέγμα του Meissner. Ο μυικός χιτώνας αποτελείται από μια έσω κυκλωτερή και μια έξω επιμήκη στοιβάδα λείων μυικών κυττάρων και το μυενερικό πλέγμα του Auerbach. Ο ορογόνος χιτώνας αποτελείται από λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού, πλούσιου σε αγγεία, λεμφαγγεία, λιπώδη ιστό, ενώ καλύπτεται από μονόστοιβο πλακώδες επιθήλιο, το μεσοθήλιο.

Η παρουσία των συστατικών της μεσοκυττάριας ουσίας είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση μιας συνεχούς, δυναμικής κατάστασης «φυσιολογικής φλεγμονής», η οποία συμβάλλει στην ιστική ομοιόσταση και φυσιολογική λειτουργία. Αυτή η κατάσταση αντανακλά τη συνεχή διέγερση του στρώματος από την εντερική χλωρίδα, και καθιστά τον ιστό έτοιμο να ανταποκριθεί σε «εισβολή νέων παθογόνων». Ωστόσο, με δεδομένο ότι «παθολογική φλεγμονή» συνιστά μηχανισμό, ο οποίος προάγει την καρκινογένεση, ο ρόλος του στρώματος-μικροπεριβάλλοντος στην παθογένεση και προαγωγή των καρκινωμάτων απαιτεί ενδελεχή διερεύνηση.

Εικόνα 1. Στοιβάδες τοιχώματος παχέος εντέρου: 1: βλεννογόνια, 2: υποβλεννογόνια, 3: μυική, 4: ορογόνια (πηγή: www.histol.chuvashia.com)

Εικόνα 2. Τοίχωμα παχέος εντέρου (πηγή: pathology.mc.duke.edu/research/PTH225.html)

Εικόνα 3. Δομή κόλου, ορθού, πρωκτικού σωλήνα
(πηγή: <http://original.britannica.com/eb/art-68639/Structures-of-the-human-large-intestine-rectum-and-anus>)

© 2003 Encyclopædia Britannica, Inc.

Εικόνα 4. Εσωτερικό του τυφλού με την ειλεοκολική βαλβίδα και κατώτερο τμήμα ανιόντος κόλου (αριστερά), πρόσθια άποψη του κατιόντος, σιγμοειδούς εντέρου και ορθού (δεξιά). (πηγή: Anatomy of the human body, 20th edition; XI. Splanchnology; 2h: The Large Intestine. © 2000 Copyright Bartleby.com, Inc.)

Εικόνα 5. Η βασική μεμβράνη διαχωρίζει το επιθήλιο από το χόριο (πηγή: sweetbeautyhaven.com)

Εικόνα 6. Επιμήκεις σωληνοειδείς αδένες στο βλεννογόνο παχέος εντέρου (πηγή: www.lab.anhb.uwa.edu.au/.../Epithel.htm)

Εικόνα 7. Αδένας βλεννογόνου παχέος εντέρου με απορροφητικά και βλεννώδη κύτταρα. Τα βλεννώδη κύτταρα έχουν εκκριτικά κοκκία και αρχίζουν να γεμίζουν τον αυλό με εκκρίσεις. Οι μικρολάχνες των απορροφητικών κυττάρων συμμετέχουν στην απορρόφηση ύδατος (πηγή: Basic Histology: Text & Atlas, 11th Edition, Luiz Carlos Junqueira and José Carneiro).

Εικόνα 8. Ηλεκτρονιοφωτογραφία επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου. Απεικονίζονται οι μικρολάχνες στην αυλική επιφάνεια, το καλά ανεπτυγμένο σύστημα Golgi και διατεταμένα μεσοκυττάρια διαστήματα γεμάτα με μεμβρανικά στοιχεία, που χαρακτηρίζουν την απορρόφηση ύδατος (πηγή: Basic Histology: Text & Atlas, 11th Edition, Luiz Carlos Junqueira and José Carneiro)

ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Τα νεοπλάσματα του παχέος εντέρου διακρίνονται σε καλοήθη και κακοήθη (πίνακας 1), ενώ αναπτύσσονται ακόμη και μη νεοπλασματικοί πολύποδες, οι οποίοι περιλαμβάνουν τους υπερπλαστικούς, φλεγμονώδεις και αμαρτωματώδεις. Επιπλέον, δυσπλασία (ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία) παρατηρείται σε χρόνια φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. **Πίνακας 1.** Νεοπλάσματα του παχέος εντέρου

<u>Αδενώματα</u>	<u>Καρκινώματα</u>	<u>Μη επιθηλιακές νεοπλασίες</u>	<u>Λεμφώματα</u>	<u>Καρκινοειδή</u>
σωληνώδη	αδενοκαρκινώματα	λιπώματα	διάχυτα από μεγάλα κύτταρα	EC-cell (serotonin- producing)
θηλώδη	βλεννώδη καρκινώματα	λειομυώματα	μανδύα	L-cell (glucagon like peptide- producing)
σωληνοθηλώδη	μικροκυτταρικά	νευρινώματα	MALT	μικτής διαφοροποίησης
οδοντωτά	πλακώδη	λειομυοσαρκώματα	Burkitt	
	signet-ring	αγγειοσαρκώματα		
	αδενοπλακώδη	μελανώματα		
	μυελοειδή	Kaposi σαρκώματα		
	αδιαφοροποίητα	στρωματικοί όγκοι (GIST)		

ΚΑΛΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Τα αδενώματα (αδενωματούδεις πολύποδες) αποτελούν τα πλέον συνήθη καλοήθη επιθηλιακά νεοπλάσματα. Η επίπτωσή τους σχετίζεται με την ηλικία, ποικίλλει από 20%-30% πριν την ηλικία των 40 ετών ως 40%-50% μετά την ηλικία των 60 ετών. Με βάση τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά, τα αδενώματα διακρίνονται σε επίπεδα (flat), «depressed» και «elevated». Οι δύο πρώτες κατηγορίες αδενωμάτων αναγνωρίζονται ενδοσκοπικά από τις αλλαγές στην υφή και ερυθρότητα του βλεννογόνου, ενώ τα «ανυψωμένα» συχνά φέρουν μίσχο. Με βάση την ιστολογική αρχιτεκτονική, τα αδενώματα διακρίνονται σε σωληνώδη (tubular), σωληνοθηλώδη (tubulovillous) και θηλώδη (villous), ενώ χαρακτηριστική μορφολογία έχουν τα οδοντωτά (serrate) [11]. Η παρουσία των αδενωμάτων αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα κακοήθειας, διότι έχουν δυναμικό εξαλλαγής (αλληλουχία αδενώματος-αδενοκαρκινώματος). Ο βαθμός κακοήθους δυναμικού ποικίλλει και σχετίζεται με μεγάλο μέγεθος του αδενώματος (μέγιστη διάμετρος >2 εκατοστά), μεγάλο αριθμό, κυτταρολογική ατυπία, διαταραχή ιστολογικής αρχιτεκτονικής και απουσία μίσχου [12, 13]. Επίσης, πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με αδένωμα έχουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος, ειδικά αν το αδένωμα διαγνωσθεί πριν την ηλικία των 60 ετών [14]. Αντίστοιχα, η παρουσία αδενώματος αποτελεί ένδειξη για πολυπεκτομή και για πρόωμη ολική κολονοσκόπηση για τη διάγνωση σύγχρονων ή μετάχρονων αδενωμάτων ή αδενοκαρκινώματος.

Οι μη-επιθηλιακής αρχής καλοήθεις όγκοι του παχέος εντέρου είναι λιγότερο συχνοί και προέρχονται από στρωματικά κύτταρα, όπως διάμεσα κύτταρα Cajal (GIST), λιποκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρικές ίνες. Συνήθως έχουν σαφή όρια και μπορεί

να είναι ασυμπτωματικοί. Συχνά ωστόσο, προκαλούν συμπτώματα, όπως συμπιεστικά φαινόμενα σε γειτονικές δομές, εντερική απόφραξη και αιμορραγία [15].

ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το αδενοκαρκίνωμα αποτελεί το πιο συχνό κακόηθες νεόπλασμα του παχέος εντέρου (98% επί του συνόλου). Με εξαίρεση τον καρκίνο του δέρματος, αποτελεί τον τρίτο πιο συχνό καρκίνο στους άνδρες, μετά από τον καρκίνο του προστάτη και πνεύμονα, αλλά και στις γυναίκες μετά από τον καρκίνο του μαστού και πνεύμονα. Συνολικά και στα δύο φύλα, αποτελεί το δεύτερο αίτιο ειδικής θνησιμότητας από καρκίνο στο δυτικό κόσμο. Συνιστά σημαντικό αίτιο νοσηρότητας, προκαλώντας συχνές και σοβαρές επιπλοκές, είτε άμεσα είτε λόγω της θεραπευτικής αντιμετώπισης. Συχνές συνέπειες είναι η έκπτωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, πολυάριθμες νοσηλείες και απώλεια παραγωγικού χρόνου. Η νόσος προκαλεί σημαντική επιβάρυνση στα συστήματα υγείας παγκοσμίως, δαπάνες προσωπικού και υλικοτεχνικού εξοπλισμού, ενώ αποτελεί κομβικό αντικείμενο μελέτης και έρευνας για ένα μεγάλο αριθμό ερευνητικών ιδρυμάτων.

Το 1990, η επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου εκτιμήθηκε στις 783.000 νέες περιπτώσεις, ενώ συνεχώς παρουσιάζει αυξητική τάση (εικόνα 9). Στις Η.Π.Α. το 2002, η επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου εκτιμήθηκε στις 148.300 νέες περιπτώσεις, ενώ η ειδική θνησιμότητα εκτιμήθηκε στους 56.600 θανάτους [16]. Προσβάλλει άνδρες και γυναίκες εξίσου, με περίπου 401.000 νέες περιπτώσεις σε άνδρες και 381.000 σε γυναίκες ετησίως [17]. Εκτιμάται ότι περισσότεροι από 394.000 θάνατοι από καρκίνο παχέος εντέρου συμβαίνουν παγκοσμίως, ενώ η νόσος αντιπροσωπεύει το 9.4% των

κακώθων όγκων στους άνδρες και το 10.1% στις γυναίκες. Η επίπτωσή του ποικίλλει σε διαφορετικά κοινωνικο-οικονομικά περιβάλλοντα, όντας σαφώς μεγαλύτερη στις ανεπτυγμένες χώρες, σε σχέση με «υπό ανάπτυξη» χώρες. Ρόλο σε αυτή τη διαφορά διαδραματίζουν πιθανότατα περιβαλλοντικοί παράγοντες, κυρίως διατροφικές συνήθειες και τρόπος ζωής. Σε βιομηχανοποιημένες κοινωνίες (Βόρεια Αμερική, Ευρώπη, Αυστραλία), η επίπτωσή του ανέρχεται σε 12.6% όλων των καρκίνων στους άνδρες και σε 14.1% στις γυναίκες. Σε μη βιομηχανοποιημένες κοινωνίες, τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 7.7% και 7.9%, αντίστοιχα [17]. Πληθυσμοί με διαφορετικό τρόπο ζωής παρουσιάζουν διαφορετική επίπτωση της νόσου. Επιπλέον, μετανάστες από περιοχές με αυξημένη επίπτωση, αποκτούν γρήγορα (εντός μιας γενεάς) το πρότυπο επίπτωσης του νέου περιβάλλοντος, όταν μεταναστεύουν σε περιοχές χαμηλής επίπτωσης. Το αντίστροφο συμβαίνει κατά την αντίστροφη μετανάστευση. Συνεπώς, ο καρκίνος παχέος εντέρου θεωρείται νόσος κυρίως περιβαλλοντικής αιτιολογίας, ενώ το 70.8% των περιπτώσεων της νόσου έχει συσχετιστεί με περιβαλλοντικά ερεθίσματα [17]. Επομένως, η κατανόηση της παθογένειας της νόσου σε συνδυασμό με επιδημιολογικές παρατηρήσεις συντελεί στην ανάδειξη των παραγόντων κινδύνου, με απώτερο σκοπό την εφαρμογή προγραμμάτων πρωτογενούς πρόληψης.

Μεγάλες διαφορές υπάρχουν και στα ποσοστά επιβίωσης με βάση το στάδιο της νόσου, το οποίο θεωρείται ο πλέον κρίσιμος προγνωστικός παράγοντας. Επίσης, έντονες διαφορές παρατηρούνται και στη θνητότητα των ασθενών στα διάφορα βιομηχανοποιημένα κράτη (εικόνα 10). Το γεγονός αυτό δεν εξηγείται εύκολα, αλλά μπορεί να αποδοθεί στο στάδιο της νόσου τη χρονική στιγμή της διάγνωσης ή/και στην επιλογή θεραπευτικής μεθόδου.

Σε ο,τι αφορά στο φύλο και την ηλικία, ο καρκίνος του παχέος εντέρου παρατηρείται κυρίως σε άνδρες άνω των 50 ετών. Οι περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου πριν την ηλικία των 40 ετών είναι λίγες (6-8%) και σχετίζονται συνήθως είτε με ισχυρή γενετική προδιάθεση ή με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου [18]. Ενώ στο παρελθόν η νόσος εντοπιζόταν κυρίως στο αριστερό κόλον (σιγμοειδές και ορθό), πρόσφατα παρατηρείται αύξηση της συχνότητας εντόπισης στο δεξιό κόλον. Το γεγονός αυτό επιτείνει ιδιαίτερα τη σημασία της δευτερογενούς πρόληψης, διότι το αδενοκαρκίνωμα δεξιού κόλου συχνά είναι ασυμπτωματικό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ανεύρεση ενός κακοήθους όγκου σε σιγμοειδοσκόπηση οφείλει να συνοδεύεται από ολική κολονοσκόπηση, διότι στο 5% των περιπτώσεων συνυπάρχει σύγχρονο αδενοκαρκίνωμα, και στο 4% μετάχρονο αδενοκαρκίνωμα εντός χρονικού διαστήματος δύο ετών [19]. Τα αδενοκαρκινώματα είναι συνήθως μη βλεννώδη, ενώ ο βαθμός κακοήθειας/διαφοροποίησης ποικίλλει.

Εικόνα 9. Επίπτωση καρκίνου παχέος εντέρου στη Μεγάλη Βρετανία, ανά ηλικία και φύλο (πηγή: student.bmj.com/issues/00/12/education/452.php)

Εικόνα 10. Επιβίωση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου σε 4 βιομηχανοποιημένα κράτη (πηγή: student.bmj.com/issues/00/12/education/452.php)

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου αποτελεί πολυπαραγοντική οντότητα, με κομβικό ρόλο να διαδραματίζουν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Όπως φαίνεται και παρακάτω, οι παράγοντες κινδύνου αφορούν τη διαίτα και τον τρόπο ζωής. Δίαιτα πλούσια σε ζωικά λίπη, θερμίδες, και χαμηλή σε φυτικές ίνες, φρούτα και πράσινα λαχανικά κατέχει σημαντική θέση, ενώ η άφθονη κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα έχουν σχετισθεί με την παθογένεια της νόσου [20]. Η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος και το μεταβολικό σύνδρομο, συχνά συνυπάρχουν και υπαγορεύουν ένα σύγχρονο δυτικό τρόπο ζωής [21]. Προστατευτική δράση φέρονται να παρουσιάζουν τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ) και η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης [22, 23]. Η χρόνια παρουσία ενεργού ελκώδους κολίτιδας αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου, ο οποίος είναι υψηλότερος σε ασθενείς με πρώιμη έναρξη ή/και εκτεταμένη νόσο (πανκολίτιδα), καθώς και με ανάπτυξη δυσπλασίας [24, 25]. Συγκεκριμένα, ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα έχουν 20 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, καθώς και 4 φορές μεγαλύτερη ειδική θνησιμότητα. Προσβολή άνω του μισού του παχέος εντέρου από τη φλεγμονώδη διεργασία σχετίζεται με κίνδυνο 15%, ενώ η παρουσία δυσπλασίας αποτελεί ένδειξη για κολεκτομή.

Η καρκινογένεση συνιστά αποτέλεσμα μιας δυναμικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και γενετικούς παράγοντες. Ο βαθμός γενετικής προδιάθεσης ποικίλλει από άτομο σε άτομο, και εξαρτάται από την παρουσία κληρονομήσιμων μεταλλάξεων σε γονίδια-κλειδιά σε μείζονες κυτταρικές διαδικασίες, όπως διαφοροποίηση, απόπτωση, μετανάστευση. Υπάρχουν συγκεκριμένα σύνδρομα, τα οποία σχετίζονται με την παρουσία μεταλλαγμένων γονιδίων και με τον κίνδυνο

ανάπτυξης της νόσου. Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση είναι καλά χαρακτηρισμένο σύνδρομο, το οποίο οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου APC [26]. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη με πολλά δομικά «μοτίβα» διαντίδρασης με άλλα πρωτεϊνικά μακρομόρια. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων [27] και συμμετέχει ενεργά σε κομβικές κυτταρικές διεργασίες, όπως πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, απόπτωση, προσκόλληση [28].

Η πρωτεΐνη APC δρα ογκοκατασταλτικά, αναστέλλοντας τη δράση του μονοπατιού της β-κατενίνης (εικόνα 11). Συγκεκριμένα, δημιουργεί σύμπλοκο με την GSK-3, τη β-κατενίνη, και την αξίνη, με συνέπεια τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης. Η χημική αυτή τροποποίηση οδηγεί σε αποδόμηση της β-κατενίνης στο πρωτεάσωμα [29], με αποτέλεσμα την αναστολή του μονοπατιού. Αδρανοποιητικές μεταλλάξεις στην APC οδηγούν σε δομικές αλλοιώσεις, με συνέπεια τη διαταραχή σχηματισμού του συμπλόκου. Έτσι, η β-κατενίνη παραμένει ελεύθερη και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου διαντιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως αυτούς των T-κυττάρων (T-cell factors/TCFs). Ο παράγοντας TCF-4 αποτελεί το κύριο μέλος αυτής της οικογένειας στα επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου, ενώ ενεργοποίησή τους οδηγεί σε υπερέκφραση ογκογονιδίων, όπως το c-myc και η κυκλίνη D1 [30, 31]. Επομένως, η β-κατενίνη έμμεσα ενεργοποιεί τη μεταγραφή ογκογονιδίων, υπεύθυνων για τον πολλαπλασιασμό και αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου. Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη APC δρα κατασταλτικά, απενεργοποιώντας το μονοπάτι και περιορίζοντας τη μεταγραφή ογκογονιδίων. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (gain-of-function) στο γονίδιο της β-κατενίνης έχουν βρεθεί στο 50% των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου με φυσιολογική πρωτεΐνη APC [32]. Αδρανοποιητικές μεταλλάξεις

(loss-of-function) στο γονίδιο APC παρατηρούνται περίπου στο 85% των σποραδικών καρκινωμάτων του παχέος εντέρου και αποτελούν κρίσιμο βήμα στο σχηματισμό αδενωμάτων, δηλαδή νωρίς κατά την πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης [33].

Εικόνα 11. Ο ρόλος της πρωτεΐνης APC στην καρκινογένεση παχέος εντέρου (πηγή: www.mdc-berlin.de/.../index.html)

Επιπλέον, η πρωτεΐνη APC εμπλέκεται σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση. Η β-κατενίνη συνδέεται με την Ε-κατχερίνη, μια πρωτεΐνη-συστατικό των ζωνών πρόσφυσης, ιδιαίτερα σημαντική για την κυτταρική προσκόλληση. Επίσης, η πρωτεΐνη APC φέρεται να αλληλεπιδρά με το σύστημα κυτταρικού σκελετού και μικροσωληνίσκων, καθώς και με το σύστημα των Rac και Rho GTP-δεσμευτικών πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση [34].

Η καρκινογένεση χαρακτηρίζεται από γενετική αστάθεια, σε επίπεδο είτε χρωμοσωμάτων, είτε γονιδίων. Χρωμοσωμική αστάθεια είναι ο πιο συχνός τύπος

γενετικής αστάθειας στον καρκίνο του παχέος εντέρου [33]. Στο σύνδρομο HNPCC, παρατηρείται μικροδορυφορική αστάθεια, η οποία αφορά σε ιδιαίτερα συχνή παρουσία μεταλλάξεων σε μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του DNA [35]. Αυτό οφείλεται στην ανεπάρκεια του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (mismatch repair), διαδικασία που διεκπεραιώνεται από ειδικά ένζυμα, όπως το MLH1 και το MSH2 [36]. Υπερμεθυλίωση του υποκινητή (promoter) αυτών των γονιδίων οδηγεί σε απενεργοποίηση της μεταγραφής τους, με συνέπεια την αύξηση της συχνότητας λαθών κατά την αντιγραφή του DNA και τη συσσώρευση γενετικών μεταβολών σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Το 10-15% των σποραδικών αδενοκαρκινωμάτων χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική αστάθεια, καταδεικνύοντας τη σημασία των επιδιορθωτικών ενζύμων τόσο σε κληρονομήσιμους όσο και σποραδικούς κακοήθεις όγκους [37]. Τέλος, το σύνδρομο Cowden χαρακτηρίζεται από αδρανοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο PTEN, το οποίο αναστέλλει το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, ένα μονοπάτι με καίριο ρόλο σε διαδικασίες κυτταρικής αύξησης [38].

ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Είναι φανερό ότι ενδοκυττάρια υπάρχει πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία βρίσκονται σε δυναμική κατάσταση αλληλεπίδρασης (cross-talk) (εικόνα 12). Βλάβες στα συστατικά τέτοιων μονοπατιών, από μόνες δεν είναι ικανές να επάγουν καρκινογένεση, αλλά μειώνουν τον ουδό της. Όταν πολλές τέτοιες βλάβες συσσωρευτούν στο κύτταρο, ενεργοποιούνται μηχανισμοί κυτταρικής εξαλλαγής. Σε κακοήθεις συμπαγών όγκων, συνήθως απαιτούνται 5-7 τέτοιες βλάβες, ώστε να υπερκεραστεί ο ουδός καρκινογένεσης. Κάποιες βλάβες κληρονομούνται, ενώ άλλες δημιουργούνται υπό την επίδραση εξωγενών παραγόντων. Ο αριθμός των

κληρονομήσιμων βλαβών ποικίλλει από άτομο σε άτομο, και εκφράζεται συχνά στα πλαίσια ενός θετικού οικογενειακού ιστορικού.

Εικόνα 12. Cross-talking ανάμεσα σε σηματοδοτικά μονοπάτια

R: υποδοχέας, K1: κινάση 1, K2: κινάση 2, K3: κινάση 3, TF: μεταγραφικός παράγοντας

Το μοντέλο ορθοκολικού αδενώματος-αδenoκαρκινώματος συνιστά κλασικό παράδειγμα μιας τέτοιας πολυσταδιακής διαδικασίας (εικόνα 13). Οι όγκοι του παχέος εντέρου «επάγονται» μέσα από μια σειρά διακριτών κλινικών και ιστοπαθολογικών σταδίων. Αρχικά, περιοχή φυσιολογικού βλεννογόνου καθίσταται υπερπλαστική λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο APC με επακόλουθη ανάπτυξη δυσπλαστικής κρύπτης (aberrant crypt foci-ACF) [33]. Στη συνέχεια, υπερέκφραση του γονιδίου COX-2, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του ενζύμου, γεγονός που σχετίζεται με ανάπτυξη αδενώματος. Διαδοχικές μεταλλάξεις, όπως αυτές του ογκογονιδίου K-RAS οδηγούν σε μεγαλύτερο

μέγεθος αδενώματος και σε μεταπλαστικές περιοχές [39]. Μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια p16 και p53, παρέχουν πλεονέκτημα επιβίωσης σε μεταπλαστικά κύτταρα, τα οποία επικρατούν [40]. Σε ένα από αυτά τα «προς εξαλλαγή» κύτταρα, μετάλλαξη του γονιδίου DCC, μετατρέπει το κύτταρο σε κακόηθες, ξεπερνώντας όλους τους ενδογενείς αμυντικούς μηχανισμούς [41]. Η όλη διαδικασία αποτελεί συνέπεια γενετικών αλλαγών σε ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, και σε γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση [42].

Εικόνα 13. Πολυσταδιακή διαδικασία καρκινογένεσης στο βλεννογόνο παχέος εντέρου (πηγή: www.rcsed.ac.uk/journal/svol2_5/205002.html)

Η διερεύνηση των γενετικών αλλαγών στα αδενώματα και η σύγκρισή τους με τις αντίστοιχες αλλαγές στα αδενοκαρκινώματα παρέχει πληροφορίες σχετικά με την καρκινογένεση στο παχύ έντερο. Ο αριθμός των κυττάρων που συμμετέχει σε κάθε ένα από αυτά τα στάδια καθώς και ο χρόνος παραμονής τους σε κάθε ένα από αυτά δεν είναι γνωστός και ποικίλλει ανά περίπτωση. Κληρονομήσιμες και σωματικές μεταλλάξεις με την επίδραση της «κλωνικής επιλογής» συντελούν στην ανάδειξη ενός κακόηθους

κλώνου, ο οποίος στη συνέχεια υφίσταται νέες αλλαγές, δίνοντας γένεση σε υποκλώνους, συχνά πιο επιθετικούς και ανθεκτικούς στη θεραπεία (tumor progression).

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Τα συμπτώματα και σημεία της νόσου είναι συχνά μη ειδικά και ποικίλλουν ανά περίπτωση [43]. Γενικά, η εντόπιση στο αριστερό κόλον χαρακτηρίζεται περισσότερο συμπτωματική σε σχέση με το δεξιό κόλον. Αιμορραγία από το ορθό, εντερική απόφραξη με συνοδό ναυτία, έμετο, αλλαγή στη συχνότητα και στο πρότυπο των κενώσεων και άτυπο κοιλιακό άλγος συχνά αποδίδονται σε όγκους του αριστερού κόλου. Αλλαγές στις κενώσεις αφορούν όχι μόνο στη συχνότητα, αλλά και στο σχήμα των κοπράνων, στο χρώμα, στο μέγεθος και στην παρουσία αίματος ή/και βλέννης. Οι όγκοι του δεξιού κόλου συχνά παραμένουν ασυμπτωματικοί για αρκετό χρονικό διάστημα και εκδηλώνονται έμμεσα με κόπωση, αδυναμία, ανορεξία, απώλεια σωματικού βάρους και σιδηροπενική αναιμία λόγω της χρόνιας μικροσκοπικής απώλειας αίματος. Ορισμένες φορές, άτυπο κοιλιακό άλγος και ψηλαφητή μάζα στο δεξιό λαγόνιο βόθρο σηματοδοτούν την παρουσία της νόσου. Παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις δεν είναι πολύ συχνές και ειδικές, ενώ θρομβώσεις συμβαίνουν λόγω της υπερπηκτικότητας που προκαλούν τα αδενοκαρκινώματα. Επίσης, πόνος στο δεξιό υποχόνδριο ή βήχας συνιστούν εκδηλώσεις μεταστατικής νόσου στο ήπαρ ή στους πνεύμονες αντίστοιχα. Γενικά, κάθε επεισόδιο ανεξήγητης αιμορραγίας από το ορθό ή σιδηροπενικής αναιμίας σε άτομα >40 ετών πρέπει να διερευνάται για τον αποκλεισμό της νόσου. Δακτυλική εξέταση, δοκιμασία ανίχνευσης αίματος στα κόπρανα, σιγμοειδο/κολονοσκόπηση και απεικονιστικές δοκιμασίες, όπως αξονική τομογραφία κοιλίας χρησιμοποιούνται συχνά για τη διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου, ενώ οριστική διάγνωση προϋποθέτει την

εξέταση ιστού μετά από βιοψία. Η ποσοτικοποίηση καρκινοεμβρυικού αντιγόνου (CEA) έχει περιορισμένο ρόλο στην πρωτογενή διάγνωση, αλλά συχνά χρησιμοποιείται για την ανάδειξη υποτροπής, ειδικά αν έχει επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα μετά τη θεραπευτική παρέμβαση [44].

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου ποικίλλουν ανά περίπτωση. Συνήθως, οι όγκοι έχουν πολυποειδή μορφολογία με ενδοαυλική επέκταση (πιο συχνά στο δεξιό κόλον), ή δακτυλιοειδή με κυκλοτερή ανάπτυξη και απόφραξη του αυλού (πιο συχνά στο αριστερό κόλον). Επίσης, παρατηρείται ενδοφυτική (ελκωτική) ανάπτυξη με ενδοτοιχωματική ή διάχυτη διήθηση (πλαστική λινίτιδα), ενώ συχνά παρατηρείται αλληλεπικάλυψη ανάμεσα στους τύπους αυτούς.

Ιστοπαθολογικά, οι αδενικοί σχηματισμοί αποτελούν κυρίαρχο χαρακτηριστικό της νόσου, αλλά ποικίλλουν ως προς τη μορφολογία και το μέγεθος. Διακρίνονται επιμέρους σε διάφορους ιστολογικούς τύπους (πίνακας 1). Το βλεννώδες συνίσταται από βλέννη >50% και συχνά σχηματίζει κυψελοειδείς δομές, ενώ το καρκίνωμα με δακτυλιοειδή κύτταρα (signet-ring) χαρακτηρίζεται από κύτταρα με άφθονη κυτταροπλασματική βλέννη, συγκεντρωμένη σε κυστίδιο, το οποίο εκτοπίζει τον πυρήνα. Το αδеноπλακώδες φαινοτυπικά ανήκει ανάμεσα στο αδενοκαρκίνωμα και στο καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου. Το μυελοειδές αποτελεί σπάνιο ιστολογικό τύπο και απαρτίζεται από κύτταρα με κενотоπιώδη πυρήνα, έντονο πυρηνίσκο, και άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και από έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση στο χόριο. Το

αδιαφοροποίητο έχει ποικίλα χαρακτηριστικά και δεν εμφανίζει ένδειξη διαφοροποίησης [45].

Σε ότι αφορά το βαθμό διαφοροποίησης/κακοήθειας (grade), τα αδενοκαρκινώματα διακρίνονται σε καλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης και αντίστοιχα σε χαμηλού και υψηλού βαθμού κακοήθειας [45]. Σε περίπτωση ετερογενούς διαφοροποίησης, το στοιχείο χαμηλότερης διαφοροποίησης χαρακτηρίζει τον όγκο, εκτός αν πρόκειται για τη διηθητική παρυφή («μέτωπο») του όγκου, ο οποίος συχνά εμφανίζει εστίες χαμηλής διαφοροποίησης. Παρουσία αδενίων >95% χαρακτηρίζει τα καλά διαφοροποιημένα, 50-95% τα μέτρια και <50% τα χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα, ενώ <5% χαρακτηρίζει τα αδιαφοροποίητα. Αξιοσημείωτα, η διήθηση μόνο του χορίου από κακοήγη κύτταρα δεν αυξάνει τον κίνδυνο μεταστατικής διασποράς της νόσου.

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του παχέος εντέρου θεωρείται το κλινικό στάδιο, που αντιπροσωπεύει την ανατομική έκταση της νόσου. Υπάρχουν ποικίλα συστήματα σταδιοποίησης, όπως το σύστημα Dukes, Astler Collier και TNM κατά AJCC (εικόνα 14-17). Η συσχέτιση της πενταετούς επιβίωσης με το κλινικό στάδιο είναι χαρακτηριστική, καθιστώντας το κλινικό στάδιο ως το σημαντικότερο προγνωστικό παράγοντα [45].

Εικόνα 14. Στάδιο κατά TNM (πηγή: en.sanofi-aventis.com/healthcare/cancer_research)

The TNM classification and the Dukes classification

T1: νόσος στο βλεννογόνο/υποβλεννογόνο

T2: επέκταση στην μυική στοιβάδα, χωρίς πλήρη διήθηση μυικής στοιβάδας

T3: πλήρη διήθηση μυικής στοιβάδας, χωρίς επέκταση σε περιβάλλοντες ιστούς/όργανα

T4: πλήρη διήθηση μυικής στοιβάδας, με επέκταση σε περιβάλλοντες ιστούς/όργανα

N0: όχι διηθημένοι λεμφαδένες

N1: 1 to 3 περιοχικοί διηθημένοι λεμφαδένες

N2: ≥ 4 περιοχικοί διηθημένοι λεμφαδένες

M0: όχι μετάσταση

M1: μετάσταση

Το σύστημα Astler Coller προτάθηκε το 1954 ως τροποποίηση του συστήματος Dukes. Το στάδιο A αφορά νόσο περιορισμένη στο βλεννογόνο, το στάδιο B1 μερική διήθηση μυικής στοιβάδας, το B2 πλήρη διήθηση της μυικής στοιβάδας με επέκταση στον ορογόνο, ενώ τα στάδια C1 και C2 αντιστοιχούν στα στάδια B1 και B2 με επιπλέον

λεμφαδενική επέκταση. Περαιτέρω τροποποιήσεις αφορούν την προσθήκη του σταδίου B3 που αφορά διήθηση γειτονικών οργάνων, C3 (B3 με θετικούς λεμφαδένες), και σταδίου D που σηματοδοτεί την παρουσία μεταστατικής νόσου. Ωστόσο, το πλέον διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο σταδιοποίησης αποτελεί το σύστημα AJCC, το οποίο βασίζεται στην ταξινόμηση TNM, όπου T: tumor, N: node, M: metastasis, όπως φαίνεται παρακάτω (εικόνα 15). Στην ίδια εικόνα παρουσιάζεται η πενταετής επιβίωση ανάλογα με το στάδιο της νόσου.

Εικόνα 15. (πηγή www.molecularonc.com/mor/mor010118.html)

TABLE 1
AJCC Staging of Colorectal Cancer

Stage	T stage	N stage	M stage	Five-year survival, %*
I	T1 or T2	N0	M0	93.2
IIa	T3	N0	M0	84.7
IIb	T4	N0	M0	72.2
IIIa	T1 or T2	N1	M0	83.4
IIIb	T3 or T4	N1	M0	64.1
IIIc	Any T	N2	M0	44.3
IV	Any T	Any N	M1	8.1

AJCC = American Joint Committee on Cancer; M0 = no distant metastasis; M1 = distant metastasis; N0 = no regional lymph node metastasis; N1 = metastasis to 1–3 regional lymph nodes; N2 = metastasis to 4 or more regional lymph nodes; T1 = tumor invades submucosa; T2 = tumor invades muscularis propria; T3 = tumor invades through muscularis propria into the subserosa or nonperitonealized pericolic tissues; T4 = tumor invades other organs or structures and/or perforates visceral peritoneum

*According to Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database
Adapted from the American Society of Clinical Oncology¹

Εικόνα 16. Στάδιο κατά Dukes (πηγή: www.sgpgi.ac.in/path/seminars/ccastage.html)

Εικόνα 17. Στάδιο κατά Astler Coller (πηγή: www.sgpgi.ac.in/path/seminars/ccastage.html)

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Εκτός από το στάδιο της νόσου και το βαθμό διαφοροποίησης που αποτελούν κλινικές παραμέτρους της νόσου, πληθώρα μοριακών παραμέτρων έχει συσχετιστεί με την πρόγνωση της. Η παρουσία ανευπλοειδίας (αριθμός χρωμοσωμάτων μη ακέραια πολλαπλάσιος του φυσιολογικού) έχει αξιολογηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας σε 13 μελέτες [46]. Επίσης, η παρουσία μεγάλου ποσοστού κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού (φάση S, G2, M του κυτταρικού κύκλου) έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση [46]. Ωστόσο, η προγνωστική αξία των δύο αυτών παραμέτρων δεν έχει τεκμηριωθεί, και η χρήση τους δε θεωρείται επιβεβλημένη στη κλινική πρακτική [47].

Ο προγνωστικός ρόλος του ογκογονιδίου K-RAS δεν έχει επαληθευθεί. Υπάρχουν μελέτες που δε συσχετίζουν την παρουσία μεταλλάξεων στο K-RAS με χαμηλή επιβίωση, ενώ άλλες διαπιστώνουν μια τέτοια συσχέτιση [48]. Μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο αυτό έχουν συσχετιστεί με καλύτερη ανταπόκριση σε προεγχειρητική χημειοακτινοθεραπεία σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο του ορθού [49] καθώς και με μειωμένη ανταπόκριση στη συμπληρωματική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου III [50]. Πρόσφατα, η παρουσία μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο K-RAS συσχετίστηκε με ελλιπή ανταπόκριση στο cetuximab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά ανοσολογικά με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), και έχει ένδειξη για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της μεταστατικής νόσου [51-53].

Το γονίδιο p53 θεωρείται το πιο συχνά μεταλλαγμένο ογκογονίδιο σε κακοήθεις όγκους. Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει τόσο μεταβολές στην έκφραση του p53 όσο και μεταλλάξεις του με την πρόγνωση της νόσου, ενώ άλλες μελέτες απέτυχαν να επιβεβαιώσουν τέτοιες συσχετίσεις [54, 55, 56]. Αντιφατικά δεδομένα υπάρχουν και για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο DCC, το οποίο κωδικοποιεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη με ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μελέτη έδειξε ότι αδενοκαρκινώματα σταδίου II (κατά AJCC) με απώλεια του γονιδίου DCC συμπεριφέρονται κλινικά σαν εκείνα σταδίου III [57], ενώ άλλη μελέτη συσχέτισε την απώλεια του γονιδίου με χαμηλότερη επιβίωση [58]. Η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας έχει συσχετιστεί με λιγότερες μεταστάσεις, μεγαλύτερη επιβίωση και καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία [59-61].

ΠΡΟΛΗΨΗ

Η πρόληψη διακρίνεται σε πρωτογενή, η οποία αφορά την αποφυγή παραγόντων κινδύνου, δευτερογενή, η οποία αφορά στην εφαρμογή διαγνωστικών δοκιμασιών με στόχο την πρόωμη διάγνωση της νόσου και τριτογενή που αφορά στην αποκατάσταση της υγείας και ποιότητας ζωής των ασθενών που έχουν ήδη νοσήσει καθώς και την αποφυγή υποτροπών. Ήδη, από την εποχή του Ιπποκράτη, η έννοια της πρόληψης κατέχει σημαίνουσα θέση στην ιατρική πρακτική, διότι χαρακτηρίζεται από αποτελεσματικότητα, ασφάλεια και στερείται κόστους σε σχέση με τη χορήγηση θεραπείας.

Οι παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου φαίνονται παρακάτω [62]:

1. Ηλικία (>50 ετών)

2. Διατροφή - υπερβολική κατανάλωση κόκκινου κρέατος, ζωικού λίπους
3. Έλλειψη φυσικής δραστηριότητας
4. Παχυσαρκία ?
5. Διαβήτης ?
6. Κάπνισμα ?
7. Ουρητηροσιγμοειδοστομία
8. Αλκοόλ (κατανάλωση άφθονης ποσότητας μπύρας σχετίζεται με καρκίνο ορθού)
9. Φλεγμονώδης νόσος εντέρου, κυρίως ελκώδης κολίτιδα με παρουσία περιοχών δυσπλασίας, >8 χρόνια παρουσία ενεργού νόσου.
10. Ατομικό και οικογενειακό ιστορικό αδενωματωδών πολυπόδων μεγάλου μεγέθους (>1εκ), αριθμού, με κυτταρολογική ατυπία, χωρίς μίσχο
10. Ατομικό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου
11. Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου: 5 – 10% των ασθενών έχουν κληρονομικές γενετικές ανωμαλίες:
 - α. Γονίδιο FAP (το φυσιολογικό γονίδιο είναι ογκοκατασταλτικό και μετάλλαξη / αδρανοποίησή του οδηγεί στη δημιουργία αδενωματωδών πολυπόδων στα πλαίσια του συνδρόμου οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης).
 - β. HNPCC: βλάβη σε ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA προκαλεί κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο παχέος εντέρου (Lynch Syndrome), με υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη άλλων κακοηθειών, όπως καρκίνο ενδομητρίου (43%) και ωοθηκών.
 - γ. Μετάλλαξη στο γονίδιο P1307k APC, αν και σπάνια στο γενικό πληθυσμό, σχετίζεται με ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου στους Ashkenazi Εβραίους.

δ. Σπάνια σύνδρομα, όπως Gardner, Peutz-Jechers, Turcot, Fraumeni Li, Cowden, Cronchite-Canada.

Η **πρωτογενής πρόληψη** συνίσταται στη διαδικασία αποφυγής παραγόντων κινδύνου και έχει καίρια σημασία για τη μείωση νοσηρότητας και θνησιμότητας από τη νόσο. Η **χημειοπρόληψη** στον καρκίνο του παχέος εντέρου συνίσταται στη μακροχρόνια χρήση φυσικών ή/και χημικών παραγόντων, με σκοπό την καθυστέρηση, αναστολή ή αναστροφή της ανάπτυξης αδενωμάτων, αναστέλλοντας τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα τέτοιων παραγόντων δεν έχει τεκμηριωθεί, με συνέπεια η χορήγησή τους να μην έχει ένδειξη στην κλινική πρακτική. Επίσης, η χρήση τους δεν πρέπει να υποκαθιστά την εφαρμογή προγραμμάτων δευτερογενούς πρόληψης. Παραδείγματα παραγόντων χημειοπρόληψης παρατίθενται παρακάτω [63-66]:

α. Διατροφή πλούσια σε βιταμίνη D, ασβέστιο, πολυβιταμινούχα σκευάσματα
πλούσια σε φυλικό οξύ, σελήνιο και φυτικές ίνες

β. Διατήρηση καλής φυσικής κατάστασης

γ. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ασπιρίνη, ιβουπροφένη, σουλινδάκη, σελεκοξίμπη) λόγω αναστολής COX-2 σχετίζονται με μείωση κινδύνου κατά 20–50% (η χρήση τους περιορίζεται σε υψηλού κινδύνου ασθενείς λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών, π.χ. γαστρίτιδας, πεπτικού έλκους).

δ. Difluoromethyl ornithine (DFMO)

ε. Ορμονική υποκατάσταση

στ. Στατίνες

ζ. Ursodeoxycholic acid (σε ελκώδη κολίτιδα)

Η δευτερογενής πρόληψη (screening) έχει σημαντικό ρόλο στη μείωση της θνησιμότητας από τη νόσο, οδηγώντας σε πρόωπη διάγνωση και θεραπεία [67]. Σε ασθενείς >50 ετών απαιτείται ετήσια εξέταση για ανίχνευση αίματος στα κόπρανα (occult blood test) και σιγμοειδοσκόπηση ανά 5 χρόνια ή ολική κολονοσκόπηση ανά 10 χρόνια, ή νωρίτερα αν κάποια δοκιμασία είναι θετική. Επίσης, ανεύρεση αδενωματοδών πολυπόδων αποτελεί ένδειξη για επανάληψη ολικής κολονοσκόπησης εντός 3-5 ετών.

Ατομικό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου ή αδενωματοδών πολύποδα και οικογενειακό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου (1ου βαθμού συγγενής <60 ετών / 2 πρώτου βαθμού συγγενείς) αποτελεί ένδειξη για ολική κολονοσκόπηση πριν την ηλικία των 50 ετών. Η δευτερογενής πρόληψη για άτομα υψηλού κινδύνου περιλαμβάνει γενετικές δοκιμασίες με στόχο την αναγνώριση μεταλλάξεων γονιδίων που σχετίζονται με σύνδρομα (π.χ FAP, HNPCC), ετήσια κολονοσκόπηση (από ηλικία 20 ετών) σε ασθενείς με σύνδρομο οικογενούς αδενωματοδών πολυποδίασης, ετήσια κολονοσκόπηση με λήψη αντιπροσωπευτικών βιοψιών σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, προληπτική κολεκτομή σε άτομα με σύνδρομο οικογενούς αδενωματοδών πολυποδίασης, ή με ελκώδη κολίτιδα και παρουσία δυσπλασίας, πρόωπη έναρξη τακτικών κολονοσκοπήσεων σε ασθενείς με HNPCC και αφαίρεση πολυπόδων.

Τα ποσοστά εφαρμογής δοκιμασιών δευτερογενούς πρόληψης έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, αλλά ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού δεν υποβάλλεται σε τέτοιες δοκιμασίες. Ανάμεσα στο 2002 και 2005, το ποσοστό ατόμων >50 ετών στις Η.Π.Α. που υποβλήθηκε σε προληπτική κολονοσκόπηση αυξήθηκε από 42.5% σε 46.8% [68]. Η εφαρμογή προγραμμάτων ενημέρωσης πληθυσμού και ιατρικού προσωπικού είναι απαραίτητη για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της δευτερογενούς πρόληψης

και συνεπώς τη μείωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας σχετιζόμενης με τη νόσο (εικόνα 18).

Εικόνα 18. Δευτερογενής πρόληψη, επίπτωση και θνησιμότητα ανά εθνικότητα

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία εκλογής του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι χειρουργική. Οι βασικές αρχές της χειρουργικής αντιμετώπισης αφορούν την εκτομή επαρκούς τμήματος εντέρου (κολεκτομή), του αντίστοιχου μεσεντερίου, των αγγείων που αιματώνουν τον όγκο, καθώς και λεμφαγγείων και λεμφαδένων που παροχετεύουν την περιοχή του όγκου. Απαιτείται υψηλή χειρουργική τεχνική, με σκοπό την εκτομή του όγκου επί υγιών ορίων (5 εκατοστά εκατέρωθεν του όγκου), και την en bloc εκτομή οργάνων/δομών που διηθούνται από τον όγκο [69]. Επαρκής χειρουργική σταδιοποίηση προϋποθέτει την εκτομή τουλάχιστον 12 λεμφαδένων.

Η ανάπτυξη υποτροπής της νόσου μετά από χειρουργική εξαίρεση οφείλεται συνήθως στην παρουσία μικρομεταστάσεων. Η συμπληρωματική χημειοθεραπεία αποσκοπεί στην αντιμετώπιση της μικρομεταστατικής νόσου και την αποφυγή μετάχρονων μακρομεταστάσεων [70]. Η συνεχής (continuous) ενδοφλέβια χορήγηση του αντιμεταβολίτη 5-φθοριουρακίλη σε συνδυασμό με λευκοβορίνη αποτελεί τη βάση της συμπληρωματικής μετεγχειρητικά χημειοθεραπείας κυρίως σε συνδυασμό με οξαλιπλατίνη, ενός νεότερου παραγώγου πλατίνης [71]. Επίσης, η καπεσιταμπίνη, ένα ανάλογο της 5-φθοριουρακίλης, χορηγείται από το στόμα ως εναλλακτικό φάρμακο σε αντίστοιχους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς [72]. Στη μεταστατική νόσο, συνδυασμοί των ανωτέρω με το χημειοθεραπευτικό ιρινοτεκάνη καθώς και με μονοκλωνικά αντισώματα κατά του EGFR (cetuximab, panitumumab) και του VEGF (bevacizumab) χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη με ικανοποιητικά αποτελέσματα [73]. Σε περιπτώσεις τοπικά προχωρημένης νόσου, η εισαγωγική χημειοθεραπεία στοχεύει να καταστήσει τη νόσο χειρουργικά εξαιρέσιμη. Στον καρκίνο του ορθού έχει σημαντικό ρόλο και η ακτινοθεραπεία είτε συμπληρωματικά μετά τη χειρουργική εκτομή, είτε προεγχειρητικά ιδιαίτερα σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένη νόσο σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία.

Παρά την πρόοδο στη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου, η συνολική επιβίωση παραμένει σταθερή τα τελευταία χρόνια, γεγονός που καθιστά αναγκαία την εύρεση καινούριων θεραπευτικών στρατηγικών. Οι βιολογικές θεραπείες, όπως η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη σημασία, κυρίως αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας [74]. Η ανάδειξη νέων τεχνικών, στα πλαίσια της «γονιδιωματικής/πρωτεομικής» ιατρικής και της άνθισης της

μοριακής βιολογίας προσφέρει δυνατότητες ανάλυσης του παθολογικού ιστού και του μοριακού υπόβαθρου της νόσου. Η αναζήτηση χρήσιμων βιοδεικτών που σχετίζονται με την ανταπόκριση της νόσου σε συγκεκριμένες θεραπείες, έχει στόχο την επιλογή κατάλληλων υποπληθυσμών ασθενών που έχουν αυξημένη πιθανότητα να ωφεληθούν από εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η συγκεκριμένη μελέτη αφορά στη διερεύνηση τέτοιων βιοδεικτών με σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου, με απώτερο στόχο την αξιοποίησή τους στη θεραπεία, χημειοπρόληψη και πρόγνωση της νόσου.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Το κύτταρο βρίσκεται σε συνεχή δυναμική διαντίδραση με το περιβάλλον του. Οι λειτουργίες του είναι συνάρτηση των μηνυμάτων που λαμβάνει από άλλα κύτταρα, ή/και από διαλυτούς παράγοντες, όπως κυτοκίνες, ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες. Η απόκριση σε τέτοιους παράγοντες απαιτεί την παρουσία κατάλληλων υποδοχέων, καθώς και ενδοκυτταρικών μεταγωγικών μηχανισμών με στόχο τη «μεταποίηση» του εξωκυττάριου μηνύματος σε κυτταρικές απαντήσεις. Αυτές περιλαμβάνουν μη γενωμικές λειτουργίες, όπως την απελευθέρωση κυστιδίων, την ενεργοποίηση ενζύμων, την κυτταρική κίνηση καθώς και γενωμικές, δηλαδή μεταβολή του ρυθμού έκφρασης γονιδίων. Μεμβρανικοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων έχουν χαρακτηριστεί και αποτελούν κομβικά μακρομόρια στην καρκινογένεση, διότι υπερέκφραση ή/και υπερλειτουργία τους οδηγεί σε εκσεσημασμένη ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) αποτελεί κύριο αντιπρόσωπο της οικογένειας υποδοχέων και συνίσταται σε μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 170 Kd [75]. Αποτελείται από εξωκυττάρια περιοχή για την πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα, μια διαμεμβρανική περιοχή, κι ένα κυτταροπλασματικό τμήμα με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης. Η πρόσδεση του υποδοχέα επάγει μεταβολές στη στερεοχημική διαμόρφωση του υποδοχέα, και ενεργοποιεί τη δραστικότητα κινάσης. Συνέπεια είναι η έναρξη ενός καταρράκτη φωσφορυλιώσεων με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση ενεργότητας ειδικών μεταγραφικών παραγόντων και επομένως της γονιδιακής έκφρασης. Ο υποδοχέας ανήκει στην οικογένεια επιδερμικών υποδοχέων Human Epidermal Receptor (HER), η οποία

περιλαμβάνει τέσσερις υποδοχείς, HER1 (EGFR, erb-B1), HER2 (neu, erb-B2), HER3 (erb-B3) and HER4 (erb-B4) (εικόνα 19-21). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν πολλές ομοιότητες, όπως συμμετοχή σε διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης, αγγειογένεσης, μετανάστευσης. Παρουσιάζουν, ωστόσο, διαφορές ως προς τη φύση των προσδετών και την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών. Ο υποδοχέας HER2 δεν έχει γνωστό προσδέτη, ενώ ο HER3 δεν έχει ενεργότητα κινάσης [76]. Συχνά, σχηματίζουν ομο/ετεροδιμερή στην κυτταρική μεμβράνη, με συνέπεια να διαμεσολαβούν έμμεσα μηνύματα από γειτονικούς υποδοχείς. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση σχετίζεται και με τη συγκέντρωση κατάλληλων προσαρμοστικών μακρομορίων (adaptor/effector proteins) που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του υποδοχέα. Συχνά, το σύμπλεγμα προσδέτη-υποδοχέα εσωτερικεύεται, γεγονός που σχετίζεται με τερματισμό της σηματοδότησης. Στον πίνακα 2 φαίνονται οι ενδογενείς προσδέτες του EGFR, οι οποίοι φέρονται να ενέχονται στην ανάπτυξη ενός κακόηθους όγκου, (υπερ)παραγόμενοι είτε από τα καρκινικά κύτταρα είτε από το μικροπεριβάλλον του όγκου [77]. Επίσης, υπερέκφραση του υποδοχέα HER-2 συσχετίζεται με κακή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού, ενώ υπερέκφραση του υποδοχέα EGFR συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο καρκίνου παχέος εντέρου, στομάχου, πνεύμονα και κεφαλής-τραχήλου [78].

Πίνακας 2. Ενδογενείς προσδέτες υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)

EGF
TGF-α
Amphiregulin, Epiregulin
Heparin-binding EGF
Betacellulin

Εικόνα 19. Μονοπάτι υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) (πηγή: <http://images.google.com/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/>)

Εικόνα 20. Οικογένεια επιδερμικών υποδοχέων (HER) (πηγή: <http://www.nature.com/ncponc/journal/v3/n5/images/ncponc0509-f1.jpg>)

HUMAN EPIDERMAL RECEPTOR-3 (HER-3)

Ο υποδοχέας HER-3 αποτελεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 180-Kd, η οποία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο γενετικό τόπο 12q13. Παρά το γεγονός ότι ο υποδοχέας HER-3 δεν έχει ενεργότητα κινάσης στο ενδοκυττάριο τμήμα του [79], δημιουργεί ετεροδιμερή με τα άλλα μέλη της οικογένειας HER με δυνατότητα ισχυρής επαγωγής ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Έχειδειχθεί ότι το πιο ισχυρό ετεροδιμερές είναι εκείνο με τον υποδοχέα HER-2 [80], ενώ υπερέκφραση του ετεροδιμερούς δύναται να προκαλέσει αντίσταση σε στοχευμένες βιολογικές θεραπείες. Ετεροδιμερή EGFR–HER-3 και HER-2–HER-3 ενεργοποιούν κομβικά ενδοκυττάρια μεταγωγικά μονοπάτια, όπως mitogen-activated protein kinase (MAPK), stress-activated protein kinase (protein kinase C, Jak/Stat) and phosphoinositide-3 kinase (PI-3K)/Akt/m-TOR pathways [81].

Ο υποδοχέας HER-3 έχει βρεθεί να εκφράζεται σε πληθώρα οργάνων, όπως στο μαστό, πνεύμονα, πάγκρεας και στομάχι, αλλά και σε πολλούς κακοήθεις όγκους [82-84]. Συγκεκριμένα, υπερέκφραση του HER-3 έχει αναφερθεί στο 20-30% των αδеноκαρκινωμάτων του μαστού [85], ενώ η έκφρασή του στον καρκίνο του παχέος εντέρου ποικίλλει από 36 ως 89% [86, 87]. Υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σε ο,τι αφορά στον προγνωστικό ρόλο της έκφρασης του HER-3 στον καρκίνο του παχέος εντέρου και τα δεδομένα είναι αντιφατικά. Μελέτη έδειξε [88] ότι η έκφραση του υποδοχέα HER-3 σχετίζεται με μικρότερη συνολική επιβίωση, εύρημα που δεν επιβεβαιώθηκε από άλλες μελέτες [86].

Η σημασία του σχηματισμού ετεροδιμερών με άλλους μεμβρανικούς υποδοχείς φαίνεται από μελέτες που ανέδειξαν συσχέτιση της παρουσίας διμερών HER-2/ HER-3

με αντίσταση στη θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab (εναντίον του HER-2) σε αδενοκαρκινώματα του μαστού με υπερέκφραση HER-2. Η βιολογική εξήγηση του φαινομένου έγκειται στη διαμεσολαβούμενη από το HER-2 trans-φωσφορυλίωση της ανενεργού κινάσης του HER-3, υποδεικνύοντας τη σημασία διερεύνησης του HER-3, ως βιοδείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία [89]. Trans-φωσφορυλίωση του καταλοίπου τυροσίνης στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα HER-3 δύναται να ενεργοποιήσει το μεταγωγικό μονοπάτι PI-3K/Akt/mTOR, οδηγώντας σε υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική αύξηση, παρατεταμένη επιβίωση, κινητικότητα και διηθητική συμπεριφορά [90]. Σε μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC), υπερέκφραση του υποδοχέα HER-3, ο οποίος trans-ενεργοποιείται από τον υποδοχέα EGFR, φέρεται να καθορίζει την κυτταρική απόκριση και επομένως την αποτελεσματικότητα ενός αναστολέα του EGFR (erlotinib) [91, 92]. Αντίστοιχα δεδομένα από κυτταρικές καρκινικές σειρές πνεύμονα, υποστηρίζουν ότι το gefitinib, ένας άλλος αναστολέας του EGFR, μειώνει σημαντικά το σχηματισμό ετεροδιμερών HER2/HER3, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του υποδοχέα HER-3, και έτσι την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI-3K/Akt/m-TOR [93]. Μία επιπλέον μελέτη ανέδειξε τη σημασία του υποδοχέα HER3 στην κυτταρική απόκριση στο gefitinib, επισημαίνοντας ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI-3K/Akt/m-TOR διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από το συγκεκριμένο υποδοχέα [94]. Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παγκρέατος αλλά και παχέος εντέρου, η απενεργοποίηση του ογκογονιδίου Akt από το erlotinib φαίνεται να διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα HER-3, ο οποίος επηρεάζει με τον τρόπο αυτό την αντινεοπλασματική ενεργότητα του αναστολέα [95]. Για την αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου

χρησιμοποιείται το μονοκλωνικό αντίσωμα cetuximab, εναντίον του υποδοχέα EGFR. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι ο υποδοχέας HER-3 μπορεί να χρησιμεύσει ως σημαντικός προγνωστικός, αλλά και προβλεπτικός ως προς τη θεραπεία βιοδείκτης στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η διερεύνηση της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης αλλά και της μη- φωσφορυλιωμένης μορφής του HER-3 αποτελεί σημαντικό μέρος της προσπάθειας για διαλεύκανση της παθογένειας και της βιολογικής συμπεριφοράς του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Εικόνα 21. Διμερή υποδοχέων HER και ενδοκυττάρια σηματοδότηση (πηγή: http://www.cancernetwork.com/image/image_gallery?img_id=1158456&t=1210004018310)

Figure 2: HER2 activates numerous cellular signaling pathways. EGFR-HER2 and HER2-HER2 dimers activate the Ras-Raf-MAPK pathway, the PKC and PLC pathways. HER2-HER3 dimers activate PI3K and downstream Akt pathway. This schematic is a simplistic overview of the relative contribution of the upstream receptors to downstream signaling. In fact, there is cross-talk between downstream pathways that connects them to each other adding considerable complexity to the signaling network. HER2 overexpression and overactivity results in increased signaling through all these pathways, leading to malignant transformation.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ/ESTROGEN RECEPTOR (ER) α/β

Οι ορμόνες του φύλου αποτελούν κομβικούς ρυθμιστές της διαφοροποίησης ιστών και οργάνων του αναπαραγωγικού συστήματος δρώντας διαμέσου ειδικών πυρηνικών υποδοχέων. Παράλληλα, η έκφραση αυτών των υποδοχέων σε άλλους ιστούς αναδεικνύει τη δυναμική της επίδρασης των οιστρογόνων στη διαφοροποίηση τους. Οι διαφορές στην επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου με βάση το φύλο και την ηλικία υποδηλώνουν πιθανό ρόλο των ορμονικών παραγόντων στην παθογένεια της νόσου. Η νόσος παρατηρείται πιο συχνά σε άνδρες, ενώ η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη επίπτωση της κακοήθειας [96, 97]. Η ταμοξιφαίνη (φάρμακο με προ- και αντι-οιστρογονικές ιδιότητες) και η ραλοξιφαίνη φαίνεται να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων σε κυτταρικές καλλιέργειες ορθοκολικού καρκίνου [98]. Όμως, τα δεδομένα για την επίδραση των οιστρογόνων στον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* δεν είναι σαφή. Η παρατήρηση των διαφορών στην επίπτωση, στη χημειοευαισθησία καθώς και σε μοριακά χαρακτηριστικά του καρκίνου του παχέος εντέρου στα δύο φύλα οδήγησε στην αναζήτηση του ρόλου των οιστρογονικών υποδοχέων στην παθογένεια της κακοήθειας.

Τα οιστρογόνα δρουν μέσω πρόσδεσης σε ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι βρίσκονται στον κυτταρικό πυρήνα και ρυθμίζουν την έκφραση οιστρογονο-εξαρτώμενων γονιδίων, αλληλεπιδρώντας με άλλους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Διακρίνονται σε δύο επιμέρους τύπους, τον ER α , ο οποίος περιγράφηκε αρχικά το 1962 [99], αλλά κλωνοποιήθηκε το 1986 [100], και τον ER β , ο οποίος

περιγράφηκε το 1996 [101]. Και οι δύο τύποι έχουν ανιχνευτεί τόσο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου όσο και σε επίπεδο ιστού, με τον ER β να αποτελεί τον κυρίαρχο τύπο [102,103]. Ο οιστρογονικός υποδοχέας α αποτελεί τον κύριο τύπο στο μαστό, αλλά μελέτες απέτυχαν να αναδείξουν σημαντικά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης του οιστρογονικού υποδοχέα α στο παχύ έντερο [104]. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ογκοκατασταλτική δράση του οιστρογονικού υποδοχέα α στον καρκίνο του παχέος εντέρου [105].

Αντίστοιχα, ο οιστρογονικός υποδοχέας β εκφράζεται έντονα στο παχύ έντερο και ενέχεται στη ρύθμιση έκφρασης γονιδίων τα οποία ενέχονται σε ποικίλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Αποτελείται από 530 αμινοξέα, και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα βρίσκεται στο γενετικό τόπο 14q. Εναλλακτικό μάτισμα του τελευταίου εξονίου οδηγεί στην έκφραση πέντε διαφορετικών ισομορφών του υποδοχέα, με τον ισότυπο $\beta 1$ να αντιστοιχεί στην αρχικά περιγραφείσα κλωνοποιημένη αλληλουχία, γνωστή ως ER β [106]. Οι ισομορφές $\beta 1$ και $\beta 2$ είναι οι κυρίαρχες στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου, ενώ και η ισομορφή $\beta 5$ έχει ανιχνευτεί σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες σε σχέση με τον υποδοχέα α [107]. Βιβλιογραφικά δεδομένα αναδεικνύουν πιθανές διαφορετικές λειτουργίες των κύρια εκφραζόμενων ισομορφών $\beta 1$ και $\beta 2$ σε ο,τι αφορά στην πρόσδεση με οιστρογόνα και με υποκινητές γονιδίων-στόχων [108].

Ο οιστρογονικός υποδοχέας ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων οι οποίοι έχουν δράση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων. Η δομή τους παρουσιάζεται στην εικόνα 22 και αναδεικνύει καλά συντηρημένες υποδομικές περιοχές και βιοχημικά «μοτίβα», απαραίτητα για τη λειτουργία τους. Περιλαμβάνουν μια αμινο-τελική περιοχή

για ενδο/διαμοριακές διαντιδράσεις, περιοχή πρόσδεσης σε ειδικές αλληλουχίες DNA (DNA-binding domain), μια περιοχή υπεύθυνη για σχηματισμό διμερών (hinge domain) με άλλους υποδοχείς, περιοχή σύνδεσης με τα οιστρογόνα (ligand binding domain-LDB) και μια περιοχή υπεύθυνη για την τροποποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας [109]. Υπό συνθήκες έλλειψης ορμονικής επίδρασης, ο υποδοχέας βρίσκεται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Η πρόσδεση οιστρογόνων σε ειδική περιοχή (ligand binding domain-LDB) αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, ο οποίος αποδεσμεύεται από συνκαταστολείς, εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με ειδικούς συνενεργοποιητές, προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων-στόχων (DNA-binding domain), ρυθμίζοντας το ρυθμό μεταγραφής τους (γονιδιωματική δράση) [110]. Παράλληλα, συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων σερίνης\θρεονίνης υπόκεινται σε φωσφορυλίωση ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης μεταγωγικών μονοπατιών μέσα στο κύτταρο, όπως του μονοπατιού MAPK. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει εναλλακτικό τρόπο ενεργοποίησης του υποδοχέα, ανεξάρτητα από την παρουσία προσδέτη (ορμονών), και επομένως τη σημασία της διαρκούς και πολύπλοκης διασυννομιλίας (cross-talk) μεταξύ των μονοπατιών ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Ο υποδοχέας παρουσιάζει και μη γονιδιωματικές δράσεις, ευρισκόμενος στο κυτταρόπλασμα και ρυθμίζοντας κυτταρικά γεγονότα επιδρώντας άμεσα σε επίπεδο πρωτεϊνών (εικόνα 23) [111].

Ο ρόλος των οιστρογονικών υποδοχέων στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει διερευνηθεί με ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης και ανοσοϊστοχημεία σε σχετικά μικρούς αριθμούς ασθενών, με συνέπεια η περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασής του και των πιθανών συσχετίσεων με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου να καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική.

Εικόνα 22. Δομή πυρηνικών υποδοχέων (πηγή: de.wikipedia.org /.../Nukle%C3%A4rer_Rezeptor)

Εικόνα 23. Μη γονιδιωματικές δράσεις του οιστρογονικού υποδοχέα και cross-talk με οικογένεια HER (πηγή: <http://breast-cancer-research.com/content/7/5/205/figure/F2>)

Breast Cancer Research

COREGULATORS OF TRANSCRIPTION

α. ΓΕΝΙΚΑ

Η δυναμική αλληλεπίδραση ανάμεσα στον οιστρογονικό υποδοχέα και ειδικούς συν-ενεργοποιητές\συν-καταστολείς συνιστά κομβικό γεγονός σε ό,τι αφορά στην ειδικότητα και το ρυθμό γονιδιακής έκφρασης. Η διαφορετική δράση της ίδιας ορμόνης σε διαφορετικούς ιστούς ερμηνεύεται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση ειδικών συμπαράγοντων [112]. Τέτοιες εξειδικευμένες πρωτεΐνες καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τον υποκινητή του γονιδίου στον οποίο προσδένεται ο οιστρογονικός υποδοχέας, τις άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά, τη συγγένεια με την οποία συνδέεται με τη βασική μεταγραφική μηχανή, επομένως και την τελική επίδραση στο γονιδίωμα. Οι συμπαράγοντες έχουν δυνατότητα μεταβολής της δομής της χρωματίνης τοπικά, μέσω στρατολόγησης ειδικών ενζύμων, όπως μέθυλο-μεταφοράσες, ακέτυλο-μεταφοράσες, ελικάσες, τα οποία επιδρούν στις ιστόνες και σε άλλες πρωτεΐνες του νουκλεοσώματος. Αποτέλεσμα είναι η ακριβής και ταχεία ρύθμιση κυτταρικών απόκρισεων στις διακυμάνσεις ορμονικών συγκεντρώσεων με χρόνο- και χώρο- εξαρτώμενο τρόπο.

β. AMPLIFIED IN BREAST CANCER 1 (AIB1)

Ο amplified in breast cancer 1 (AIB1), γνωστός και ως SRC-3/NCoA3/RAC3/ACTR/TRAM1, θεωρείται σημαντικός συν-ενεργοποιητής του οιστρογονικού υποδοχέα (εικόνα 24). Περιγράφηκε αρχικά στο αδеноκαρκίνωμα του μαστού και αποτελεί μέλος της οικογένειας p160 μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών του οιστρογονικού υποδοχέα. Το γονίδιο που τον κωδικοποιεί βρίσκεται στο γενετικό τόπο 20q12. Η ενεργότητα του AIB1 έχει συσχετιστεί με διαδικασίες ρύθμισης κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ το γονίδιο του συχνά υφίσταται ενίσχυση και υπερέκφραση σε

επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος του μαστού [113]. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 παρατηρείται και σε άλλες κακοήθειες, όπως των ωοθηκών [113], του ενδομητρίου [114], του στομάχου [115], του ήπατος [116], και του προστάτη [117].

Υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 σε διαγονιδιακά ποντίκια φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR, υποδεικνύοντας την ογκογόνο δράση της [118]. Επίσης, ο AIB1 θεωρείται σημαντική συνιστώσα της επιγενετικής «μηχανής», ενός συμπλόκου πρωτεϊνών που επιδρά στην έκφραση γονιδίων, επηρεάζοντας δυναμικά τη στεροδιαμόρφωση της χρωματίνης. Η αλληλεπίδραση του AIB1 με ειδικά ένζυμα, όπως μεθυλο-μεταφοράσες ιστονών και (απο)ακετυλάσες, διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη μεθυλίωση υποκινητών και (απο)ακετυλίωση ιστονών, χημικές διεργασίες που ενέχονται στη ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης [119, 120]. Επιπλέον, αύξηση των επιπέδων του AIB1, μέσω αυτοεπαγωγής της έκφρασής του, φαίνεται να έχει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ειδικότερα στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S [121]. Ακόμη, φέρεται να αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα E2F [122], υποδηλώνοντας ότι η ογκογόνος δράση του είναι ενδεχομένως μερικώς ανεξάρτητη του οιστρογονικού υποδοχέα υπό συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές συνθήκες. Παρά το ότι ο AIB1 έχει αναδειχτεί σε σημαντικό ογκογονίδιο στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σε σχέση με το ρόλο του στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. Η διερεύνηση της έκφρασής του σε συνδυασμό με εκείνη του οιστρογονικού υποδοχέα έχει ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο.

Εικόνα 24. Ο AIB1 ως συν-ενεργοποιητής του οιστρογονικού υποδοχέα, προσδεδεμένος (α) σε ειδική αλληλουχία (estrogen response element-ERE) του υποκινητή οιστρογονο-εξαρτώμενου γονιδίου-στόχου και (β) στον υποκινητή του AP1 γονιδίου (πηγή: breast-cancer-research.com/content/7/5/205)

(a)

(b)

Breast Cancer Research

γ. PROLINE-, GLUTAMIC ACID-, AND LEUCINE-RICH PROTEIN 1/ MODULATOR OF NON-GENOMIC ACTIVITY OF ER (PELP1/MNAR)

Ένας καινούργιος συμπαράγοντας, ο proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein 1 (PELP1, εικόνα 25), γνωστός και ως modulator of non-genomic activity of ER (MNAR) περιγράφηκε πρόσφατα [123]. Ο PELP1/MNAR λειτουργεί ως πρωτεΐνη-«ικρίωμα», η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση πληθώρας ενδοκυττάρων μηνυμάτων. Συγκεκριμένα, αποτελεί κομβικό μόριο σύζευξης πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς, όπως ο οιστρογονικός υποδοχέας, διαμεσολαβώντας γονιδιωματικές και μη-γονιδιωματικές δράσεις [124]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον PELP1/MNAR βρίσκεται στο γενετικό τόπο 17p13.3 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 160Kd, η οποία εκφράζεται σε πληθώρα

ιστών, όπως στο παχύ έντερο, στο μαστό, στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες και στους όρχεις [123]. Η έκφραση του γονιδίου PELP1/MNAR επάγεται από τον ER β σε πολλές κυτταρικές σειρές [125]. Ο συμπαράγοντας εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (chromatin remodeling) διαμέσου της παρεκτόπισης της ιστόνης H1, επηρεάζοντας τη γονιδιακή μεταγραφή σε καρκινικά κύτταρα. Επίσης, υφίσταται επαναλαμβανόμενους κύκλους σύνδεσης και διαχωρισμού με τον υποδοχέα του γονιδίου pS2 με βάση τα επίπεδα του οιστρογονικού υποδοχέα στον κυτταρικό πυρήνα [126]. Επιπλέον, δρα ως συνκαταστολέας άλλων ορμονοεξαρτώμενων πρωτεϊνών και πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο AP-1 και ο NF-kB, αναστέλλοντας τη διαδικασία απο-ακετυλίωσης ιστονών και έτσι τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων [127]. Παρά το ότι τοπογραφείται κυρίως στον κυτταρικό πυρήνα, ο συμπαράγοντας έχει ανιχνευτεί και στο κυτταρόπλασμα [123], προφανώς διαμεσολαβώντας μη-γονιδιωματικές δράσεις του οιστρογονικού υποδοχέα (modulator of non-genomic activity of ER-MNAR) (εικόνα 25). Φαίνεται να δρα ως «προσαρμοστική» πρωτεΐνη (adaptor protein) ανάμεσα στον οιστρογονικό υποδοχέα και την ογκοπρωτεΐνη Src, οδηγώντας σε ταχεία ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK [128]. Επίσης, φέρεται να διαντιδρά με το μεταγωγικό μονοπάτι της phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K/Akt/mTOR), και με το σηματοδοτικό μόριο signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [129,130].

Η έκφραση του PELP1/MNAR απορυθμίζεται σε πληθώρα ορμονο-εξαρτώμενων κυρίως κακοηθειών, όπως του μαστού, ενδομητρίου, προστάτη και των ωοθηκών διαντιδρώντας με ποικίλα ογκογονίδια. Σε αδenoκαρκίνωμα μαστού, η ογκογόνος δραστηριότητα του PELP1/MNAR περιλαμβάνει διαντίδραση με την ογκοκατασταλτική

πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) [131]. Ο συμπαράγοντας έχει, επίσης, συσχετιστεί με ορμονο-ανθεκτικό αδενοκαρκίνωμα του προστάτη [132]. Υπερέκφραση του ER β και του PELP1/MNAR έχει συσχετιστεί με επιθετικό (grade III) αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου, υποδηλώνοντας πιθανή συνεργική δράση των δύο πρωτεϊνών στο πλαίσιο της γένεσης των αδενοκαρκινωμάτων [133]. Συνεπώς, η διερεύνηση της έκφρασης του συμπαράγοντα στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η παρούσα μελέτη φαίνεται να είναι η πρώτη που διερευνά το ρόλο του PELP1/MNAR στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Εικόνα 25. Γονιδιωματικές και μη γονιδιωματικές δράσεις του PELP1/MNAR (πηγή: www.biocarta.com/pathfiles/h_pelp1Pathway.asp)

δ. TRANSCRIPTIONAL INTERMEDIARY FACTOR 2 (TIF2)

Ο transcriptional intermediary factor 2 (TIF2/GRIP-1/SRC-2) είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας p160 μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών του οιστρογονικού υποδοχέα και το γονίδιο που τον κωδικοποιεί βρίσκεται στο γενετικό τόπο 8q21. Η

πρωτεΐνη TIF2 έχει ανιχνευτεί σε διάφορους ιστούς [134, 135], συμπεριλαμβανομένου του παχέος εντέρου (σε φυσιολογικό βλεννογόνο και σε αδenoκαρκίνωμα) [136]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο TIF2 θεωρείται αναγκαίος συνενεργοποιητής για την έκφραση ορμονοεξαρτώμενων γονιδίων, κατά τη διαδικασία μορφογένεσης και ανάπτυξης του μαστού και του αναπαραγωγικού συστήματος στις γυναίκες [137]. Επίσης, έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαδικασιών μεταβολισμού των λιπιδίων και του ενεργειακού ισοζυγίου [138].

Το γονίδιο TIF2 θεωρείται στόχος της ενεργού μορφής της βιταμίνης D, [139], η οποία ενέχεται στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης [140] στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, ο TIF2 έχει δειχθεί να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR, ενώ η ενεργότητά του ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης άμεσα από την ογκοπρωτεΐνη AKT. Διαδραματίζει επίσης καίριο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής δράσης του οιστρογονικού υποδοχέα (εικόνα 26) σε αδenoκαρκινώματα του μαστού, γεγονός που επισημαίνει την πιθανή ογκογόνο δράση του συμπαράγοντα [141]. Ωστόσο, ο ρόλος του TIF2 ως συνενεργοποιητή του οιστρογονικού υποδοχέα στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου παραμένει ασαφής.

Εικόνα 26. Ο οιστρογονικός υποδοχέας αλληλεπιδρά με πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών και επηρεάζεται από τη δράση συμπαράγοντων, όπως ο AIB1 και ο TIF2 (πηγή: www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_4/Page_2.htm)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη μεταγονιδιατική εποχή το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει μετατοπιστεί από τα γονίδια στις πρωτεΐνες, από τη «δομική» στη λειτουργική πληροφορία, κατάσταση η οποία αντικατοπτρίζεται στο χαρακτήρα της «μεταφραστικής έρευνας» που επικρατεί. Το είδος αυτό της έρευνας προϋποθέτει τη χρησιμοποίηση μοριακών βιοδεικτών, σημαντικών στην κατανόηση της παθογένειας μιας νόσου, καθώς και στην πρόληψη, έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία.

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση του ρόλου σημαντικών τέτοιων βιοδεικτών, όπως ο υποδοχέας HER-3, οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ER) α/β , καθώς και ειδικοί συνενεργοποιητές τους, ο AIB-1, ο TIF-2 και ο PELP1/MNAR. Οι παράγοντες αυτοί διαπλέκονται σε γειτονικά μεταγωγικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι αυξητικών παραγόντων και το μονοπάτι οιστρογονικών υποδοχέων, συμβάλλοντας στην τέλεση κομβικών κυτταρικών διεργασιών, οι οποίες ενέχονται στην καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε:

1. Η έκφραση του **γονιδίου HER-3** μέσω μέτρησης επιπέδων m-RNA σε 54 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με τη μέθοδο RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).
2. Η έκφραση και κυτταρική εντόπιση της **πρωτεΐνης HER-3** σε 119 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας.
3. Η έκφραση και κυτταρική εντόπιση της **φωσφορυλιωμένης μορφής (pHER-3)** σε 119 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας.

4. Η έκφραση και κυτταρική εντόπιση των **οιστρογονικών υποδοχέων (ER) α και β** σε 113 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας.
5. Η έκφραση και κυτταρική εντόπιση του συνενεργοποιητή **PELP-1/MNAR** σε 113 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας
6. Η έκφραση και κυτταρική εντόπιση του συνενεργοποιητή **AIB-1** σε 110 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας.
7. Η έκφραση και κυτταρική εντόπιση του συνενεργοποιητή **TIF-2** σε 110 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας
8. Η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης της έκφρασης των παραγόντων αυτών σε πρωτοπαθή αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου, όπως ηλικία, φύλο, στάδιο, βαθμός διαφοροποίησης, θέση πρωτοπαθούς εστίας, ιστολογικός τύπος, διήθηση λεμφαδένων, παρουσία/απουσία υποτροπής, επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου, τελική έκβαση και συνολική επιβίωση.
9. Πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων αυτών σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδενοκαρκινώματα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ιστικά δείγματα, μονιμοποιημένα σε φορμόλη 10% και εκλεισμένα σε παραφίνη από 140 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Από αυτά, 134 δείγματα προέρχονταν από χειρουργικά παρασκευάσματα από ισάριθμες κολεκτομές που πραγματοποιήθηκαν το χρονικό διάστημα 1994–2006 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών, ενώ έξι προέρχονταν από βιοψίες. Τα δείγματα ελήφθησαν από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών και η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους κανόνες ηθικής και δεοντολογίας και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Έρευνας, Ηθικής και Δεοντολογίας και από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Το διάμεσο διάστημα παρακολούθησης ασθενών (follow-up) ήταν 53 μήνες (εύρος: 7-153). Κατά την περίοδο αυτή σημειώθηκαν 46 θάνατοι και 60 υποτροπές. Το ποσοστό επιβίωσης στην τριετία ήταν 80.5% και στην πενταετία 57.1%. Η μεθοδολογία της μελέτης καθώς και η επεξεργασία και η παρουσίαση των δεδομένων βασίστηκαν στα κριτήρια REMARK [142].

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά ασθενών

Ασθενείς	140	
Ηλικία	66 (30-90)	
Στάδιο κατά Dukes	B	53
	C	75
	D	12
Βαθμός διαφοροποίησης	I	26
	II	100
	III	14
Φύλο	άνδρες	91
	γυναίκες	49
Ιστολογικός τύπος	μη βλεννώδη	127
	βλεννώδη	13
Θέση όγκου	δεξιό κόλον	35
	αριστερό κόλον	58
	ορθό	47

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις RNA τυπικής καμπύλης για την ποσοτικοποίηση RNA δειγμάτων με τη χρήση Ribogreen

TE (μλ)	Πρότυπο RNA (μλ) stock 2μg/ml (1:50)	Ribogreen (μλ) (1:200)	Τελική συγκέντρωση RNA(ng/μλ)
0	49	49	~ 20
24.5	24.5	49	~10
44.1	4.9	49	~2
48.02	0.98	49	~0.4
49	0	49	0

ΜΕΘΟΔΟΙ

Απομόνωση RNA

Απομονώθηκε ολικό RNA από 54 ιστικά δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, μονιμοποιημένα σε φορμόλη 10% και εκλεισμένα σε παραφίνη, όπως περιγράφεται σε διεθνή βιβλιογραφία (20). Ταυτόχρονα απομονώθηκε ολικό RNA από 29 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου από αντίστοιχες τομές των ίδιων ασθενών. Συγκεκριμένα, ιστικές τομές αποπαραφινολογήθηκαν με ξυλόλη (5 min, θερμοκρασία δωματίου), η οποία στη συνέχεια απομακρύνθηκε με προσθήκη αιθανόλης. Οι τομές, αφού στεγνώσαν σε θερμοκρασία δωματίου (5 λεπτά), επώαστηκαν στους 60°C (υδατόλουτρο) για 16 ώρες μαζί με 400μλ ρυθμιστικού διαλύματος (digestion buffer) που περιείχε Tris-HCl, EDTA και sodium dodecyl sulfate (SDS). Στη συνέχεια, στο διάλυμα προστέθηκαν 10μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml) με σκοπό τη λύση του ιστού. Το RNA ακολούθως καθαρίστηκε με τη χρήση φαινόλης, χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης (phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction) και κατακρημνίστηκε με ισοπροπανόλη, παρουσίας οξικού νατρίου και γλυκογόνου (20mg/ml). Μετά από προσθήκη αιθανόλης για τον καθαρισμό του δείγματος και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων που απομονώθηκε παρέμεινε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου (5-10 λεπτά). Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30μl απεσταγμένου ύδατος και επώαστηκε στους 65°C (υδατόλουτρο για 5 λεπτά). Έπειτα, στο επαναιωρημένο ίζημα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα και ένζυμο που διασπά το DNA (DNase I, DNA-freeTM Ambion), με σκοπό την απομόνωση αμιγώς RNA, δίχως προσμίξεις DNA. Το RNA αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Ποσοτικοποίηση RNA

Το RNA στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Ribogreen (Ribogreen RNA quantitation assay, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) και κατάλληλου λογισμικού στην πλατφόρμα MX3000p (Stratagene, La Jolla, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το Ribogreen είναι μια φθορίζουσα χρωστική νουκλεϊκών οξέων με δυνατότητα ποσοτικοποίησης RNA με μεγάλη ευαισθησία. Η βασική αρχή πάνω στην οποία βασίζεται η μέτρηση της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων είναι ο καθορισμός της απορρόφησης σήματος στο φάσμα των 260nm (A_{260}). Η ευαισθησία της μεθόδου υπερκερνά την αντίστοιχη της μεθόδου που βασίζεται στη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου κατά 200 φορές, και την αντίστοιχη που βασίζεται στην απορρόφηση υπεριώδους φάσματος κατά 1000 φορές. Για την αραίωση των δειγμάτων RNA και του Ribogreen χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5 (TE assay buffer). Συγκεκριμένα, αραίωση 1:400 του RNA από κάθε δείγμα αναμίχθηκε με Ribogreen σε αναλογία 1:1 (τελική αραίωση RNA δείγματος 1:800), ενώ πρότυπο RNA χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόρφωση τυπικής καμπύλης βάση της οποίας έγινε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Ποσότητες αραιωμένου (1:50) πρότυπου RNA αναμίχθηκαν με Ribogreen σε 5 διαφορετικές αναλογίες/συγκεντρώσεις, ώστε η τυπική καμπύλη να αποτελείται από 5 σημεία, καθένα από τα οποία αντιστοιχούσε σε συγκεκριμένη συγκέντρωση RNA (ng/μl) (πίνακας 4). Για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας, η συγκέντρωση του RNA από κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές και τα αποτελέσματα σε κάθε τριπλέτα δείγματος ήταν σχεδόν ταυτόσημα. Η αρχική συγκέντρωση RNA (ng/μl) υπολογίστηκε μετά από διορθώσεις για τις αραιώσεις που είχαν πραγματοποιηθεί στο αρχικό δείγμα.

Πίνακας 5. Συστατικά αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (RT)

H ₂ O	χ μl
RNA	ψ μl
Random primers 100ng/μl	3μl
dNTPs 20mM	2μl
10Xbuffer solution	5μl
RNAase inhibitor	0.3μl
Reverse transcriptase 50U/μl	1μl

Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription-RT) RNA σε cDNA

Για την αντίδραση σύνθεσης cDNA χρησιμοποιήθηκαν 1600 ng RNA από κάθε δείγμα, τυχαίοι εκκινητές (random nonamer primers), δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), αντίστροφη μεταγραφάση (50U Stratagene reverse transcriptase, Stratagene, La Jolla, USA) με αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (10X buffer solution) και αναστολέας RNA-άσης (Rnasin plus RNAase Inhibitor, Promega Corporation), δηλαδή του ενζύμου που διασπά το RNA. Οι αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν στην πλατφόρμα MX3000p (Stratagene, La Jolla, USA), όπως αναγράφεται παρακάτω (πίνακας 5, ψ = μl RNA που αντιστοιχούν σε ποσότητα 1600ng με βάση τη συγκέντρωση RNA κάθε δείγματος και χ = συμπληρωματικός όγκος ύδατος ώστε να επιτευχθεί τελικός όγκος διαλύματος 50 μl). Αρχικά, κατάλληλες ποσότητες ύδατος και RNA για κάθε δείγμα καθώς και primers (3μl/δείγμα) παρέμειναν στους 65⁰C για πέντε λεπτά και έπειτα σε πάγο για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια, τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης προστέθηκαν και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην πλατφόρμα MX3000p. Δύο δείγματα με RNA αναφοράς (Human Reference RNA, Stratagene, La Jolla, USA) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς

(calibrators) για την προσαρμογή πιθανών αποκλίσεων μεταξύ των πειραμάτων. Επίσης, δυο δείγματα RNA δίχως την προσθήκη αντίστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες για την επιβεβαίωση απουσίας μόλυνσης των δειγμάτων με DNA.

Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης. Βασίζεται στη χρήση φθορίζοντος ιχνηθέτη (probe) με στόχο την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των γονιδιακών μεταγράφων. Η χρήση φθορίζοντος ανιχνευτή αυξάνει σημαντικά την ειδικότητα της μεθόδου, ενώ διατηρεί τη δυνατότητα μεγάλου εύρους ανάλυσης. Οι αντιδράσεις γονιδιακής ενίσχυσης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ενζύμου SureStart Taq DNA polymerase και φθορίζοντος ιχνηθέτη τύπου Taqman. Ο ιχνηθέτης είναι μια γραμμική αλληλουχία DNA, η οποία φέρει στο 5' άκρο της μια φθορίζουσα ουσία (fluorophore), ενώ στο 3' άκρο ένα μόριο που απενεργοποιεί το φθορισμό (quencher). Κατά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA από την πολυμεράση, το σημασμένο νουκλεοτίδιο στο 5' άκρο του ιχνηθέτη αποκόβεται και έτσι ελευθερώνεται η φθορίζουσα χρωστική από την επιρροή του καταστολέα του φθορισμού. Ως αποτέλεσμα, παράγεται ένα φθορίζον σήμα. Καθώς, τα προϊόντα της αντίδρασης (αντίγραφα αρχικού εκμαγείου) συσσωρεύονται, το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος χαρακτηριστικό της φθορίζουσας ουσίας αυξάνεται και ξεπερνάει έναν ουδό. Το ποσό του φθορίζοντος σήματος είναι ανάλογο με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος και ειδικά στον κύκλο της αντίδρασης που ξεπερνάει τον ουδό, είναι ανάλογο με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο

αρχικό δείγμα (επίπεδα αρχικού μεταγράφου). Καθώς, το σήμα παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε διάγραμμα ενίσχυσης (εικόνα 27), το οποίο αντανακλά τη μεταβολή της έντασης του σήματος σε κάθε κύκλο. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο αρχικός αριθμός μεταγράφων μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με βάση τον κύκλο ανίχνευσης επαρκούς ποσότητας σήματος (C_t) [143]. Επαρκής ποσότητα σήματος θεωρείται αυτή που υπερκερνά στατιστικώς σημαντικά τον ουδό ανίχνευσης, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την εκάστοτε αντίδραση. Ο κύκλος C_t είναι αντιστρόφως ανάλογος με το λογάριθμο του αρχικού αριθμού μεταγράφων, έτσι ώστε έντονα εκφραζόμενες αλληλουχίες να ανιχνεύονται σε μικρότερο αριθμό κύκλων.

Εικόνα 27. Διάγραμμα ενίσχυσης μεταγράφων γονιδίου HER-3 ($qPCR$)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιμερίζεται σε τρία στάδια. Αρχικά, απαιτείται αποδιάταξη των κλώνων DNA (template denaturation), ώστε να υπάρξει δυνατότητα πρόσδεσης εκκινητών και ιχνηθέτη στον νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA, ο οποίος δρα ως εκμαγείο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πρόσδεση εκκινητών και ιχνηθέτη (annealing), ώστε να παρέχεται δυνατότητα σύνθεσης νέου κλώνου DNA από

το ένζυμο DNA πολυμεράση. Κατά το τελευταίο αυτό στάδιο της αντίδρασης το ένζυμο DNA πολυμεράση συνθέτει το DNA και όπως προαναφέρθηκε διαχωρίζει τη φθορίζουσα ουσία από τον απενεργοποιητή. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιήθηκε σε πραγματικό χρόνο (real time) με τη χρήση κατάλληλου και ευαίσθητου φασματομετρικού θερμικού ανιχνευτή φθορισμού ενσωματωμένο στην πλατφόρμα MX3000p (Stratagene, La Jolla, USA).

Τα απαραίτητα συστατικά της αντίδρασης αναγράφονται παρακάτω. Τα ιόντα χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$) είναι απαραίτητα για τη βελτιστοποίηση συνθηκών της αντίδρασης, ενώ τα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) αποτελούν κύριες αντιδρούσες ενώσεις, εφόσον αποτελούν τους δομικούς λίθους του DNA. Η αντίδραση περιλαμβάνει και μια παθητική χρωστική αναφοράς (passive reference dye), τα επίπεδα της οποίας δε μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και έτσι παρέχει ένα σταθερό σημείο αναφοράς (baseline) για την κανονικοποίηση του σήματος των δειγμάτων. Με τον τρόπο αυτό, η χρωστική αναφοράς αντισταθμίζει μικροαποκλίσεις φθορισμού ανάμεσα στα δείγματα λόγω μικροδιαφορών στον όγκο των δειγμάτων. Το μήκος κύματος της διέγερσης και εκπομπής της χρωστικής αναφοράς είναι 584nm και 612nm, αντίστοιχα.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ποσοτικοποίηση αλληλουχιών DNA μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με μια διαφορετική τεχνική, η οποία δεν απαιτεί τη χρήση ιχνηθέτη. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη χρήση της χρωστικής SYBR Green I, η οποία έχει μεγάλη συγγένεια με την ελάσσονα αύλακα του δίκλωνου DNA. Το μήκος κύματος της διέγερσης και εκπομπής της χρωστικής αυτής είναι 497nm και 520nm, αντίστοιχα. Σε ελεύθερη κατάσταση (unbound state) δεν εκπέμπει σημαντική ποσότητα φθορισμού, ωστόσο όταν συνδέεται στο δίκλωνο DNA η εκπομπή φθορισμού

αυξάνει σημαντικά, συντελώντας στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της αντίδρασης (αποκορεσμός), το DNA καθίσταται μονόκλωνο, με συνέπεια να μη συνδέεται με τη χρωστική και να μην εκπέμπεται φθορισμός. Κατά το δεύτερο στάδιο (annealing), παράγεται δίκλωνο DNA, με δυνατότητα πρόσδεσης της χρωστικής, με συνέπεια να αρχίζει να εκπέμπεται σήμα. Κατά το τρίτο στάδιο της σύνθεσης, η σύνδεση της χρωστικής αυξάνεται ιδιαίτερα και μεγιστοποιείται η εκπομπή σήματος.

Μη ειδικά σήματα που μπορεί να παράγονται από διμερή εκκινητών ή άλλα μη ειδικά προϊόντα, ανιχνεύονται με τη χρήση καμπύλης αποδιάταξης (dissociation curve). Κατά την τεχνική αυτή, τα προϊόντα της αντίδρασης υποβάλλονται σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από 55 σε 95°C. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, τα προϊόντα της αντίδρασης αποδιατάσσονται ανάλογα με τη σύσταση και το μέγεθός τους. Η αποδιάταξη οδηγεί σε μείωση του ανιχνευόμενου σήματος. Μετρήσεις σήματος λαμβάνονται σε κάθε τιμή θερμοκρασίας, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε γράφημα (εικόνα 28). Τα αποτελέσματα βοηθούν επίσης στον καθορισμό των συνθηκών αντίδρασης. Για παράδειγμα, αν παράγεται ένα μη ειδικό προϊόν, τότε μπορεί να επιλεγεί μεγαλύτερη θερμοκρασία για την εκτέλεση του δευτέρου σταδίου της αντίδρασης, διαφοροποίηση των συστατικών της αντίδρασης ή ακόμα και επανασχεδιασμός των εκκινητών. Επομένως, κατάλληλη σχεδίαση, σύνθεση και καθαρισμός του εκκινητή συνιστούν καίρια στοιχεία για την ποιοτική εκτέλεση της μεθόδου.

Εικόνα 28. Διάγραμμα ενίσχυσης και καμπύλη αποδιάταξης μεταγράφων HER-3 από την αντίδραση βελτιστοποίησης εκκινητών

Βελτιστοποίηση εκκινητών και ανιχνευτή για το γονίδιο HER-3

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό και μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου HER-3 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκκινητών (primers) καθώς και ιχνηθέτη (probe) ειδικών για το γονίδιο HER-3. Για να υπάρχει ειδικότητα ο σχεδιασμός τους βασίζεται στην αλληλουχία του γονιδίου, ενώ υπακούει σε συγκεκριμένους κανόνες σύστασης και μήκους, ώστε να εξασφαλίζεται η βέλτιστη απόδοσή τους στην αντίδραση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο HER-3 είχαν την εξής αλληλουχία: forward: CAAGAGTGGACGGCAGAGT, reverse: GCCTTACAATGTGGGCATG. Ο ανιχνευτής Taqman που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο εξής: 6-carboxy-fluorescein-CTGTGACAGATCATATGCTGGCCA-BHQ1. Η σύνθεση των εκκινητών πραγματοποιήθηκε στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (Κρήτη, Ελλάδα) και του ανιχνευτή από την DNA Technology A/S (Aarhus C., Δανία).

Η επιλογή βέλτιστης συγκέντρωσης εκκινητών στηρίχτηκε σε δοκιμαστική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (εικόνα), στην οποία δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε εκκινητή (300, 500, 700, 900 nM). Συνολικά, δοκιμάστηκαν 16 συνδυασμοί (4X4) συγκεντρώσεων, όπως φαίνεται στον πίνακα 6. Σε κάθε αντίδραση

χρησιμοποιήθηκαν 12.5μl Sybr Master Mix (Stratagene), 0.375μl αραιωμένης χρωστικής (1:500) (Rox, Stratagene), 1μl αραιωμένου cDNA (1:10) καθώς και κατάλληλες ποσότητες εκκινητών και ύδατος ώστε ο τελικός όγκος να είναι 25 μl. Το cDNA προερχόταν από RNA, το οποίο απομονώθηκε από κυτταρική σειρά ορθοκολικού καρκίνου (HT-29) και ποσοτικοποιήθηκε με τεχνικές που περιγράφηκαν ανωτέρω. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε δυο φορές για εξασφάλιση επαναληψιμότητας. Επιπλέον, 4 αντιδράσεις έγιναν δίχως την προσθήκη cDNA, ως αρνητικοί μάρτυρες. Τελικά, με βάση τα αποτελέσματα των αντιδράσεων, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 900 nM για τον εκκινητή forward και 300 nM για το εκκινητή reverse.

Πίνακας 6. Δοκιμαστικές συγκεντρώσεις εκκινητών γονιδίου HER-3

300nM	500nM	700nM	900nM	FRW
				REV
H2O: 8.125μl frw: 1.5μl rev: 1.5μl	H2O: 7.125μl frw: 2.5μl rev: 1.5μl	H2O: 6.125μl frw: 3.5μl rev: 1.5μl	H2O: 5.125μl frw: 4.5μl rev: 1.5μl	300nM
H2O: 7.125μl frw: 1.5μl rev: 2.5μl	H2O: 6.125μl frw: 2.5μl rev: 2.5μl	H2O: 5.125μl frw: 3.5μl rev: 2.5μl	H2O: 4.125μl frw: 4.5μl rev: 2.5μl	500nM
H2O: 6.125μl frw: 1.5μl rev: 3.5μl	H2O: 5.125μl frw: 2.5μl rev: 3.5μl	H2O: 4.125μl frw: 3.5μl rev: 3.5μl	H2O: 3.125μl frw: 4.5μl rev: 3.5μl	700nM
H2O: 5.125μl frw: 1.5μl rev: 4.5μl	H2O: 4.125μl frw: 2.5μl rev: 4.5μl	H2O: 3.125μl frw: 3.5μl rev: 4.5μl	H2O: 2.125μl frw: 4.5μl rev: 4.5μl	900nM

Οριζόντια στήλη: forward (frw) primer, κάθετη στήλη: reverse (rev) primer
nM: nanomol/liter

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανιχνευτή (probe) ειδικού για το γονίδιο HER-3 (50, 100, 150, 200, 250 nM) σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης, με τη χρήση του ίδιου cDNA που χρησιμοποιήθηκε και για

την εύρεση των βέλτιστων συγκεντρώσεων των εκκινητών. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε δυο φορές, ενώ 4 επιπλέον αντιδράσεις έγιναν δίχως την προσθήκη cDNA, ως αρνητικοί μάρτυρες. Με βάση τα αποτελέσματα της αντίδρασης, η βέλτιστη συγκέντρωση για τον ανιχνευτή ήταν 200 nM (εικόνα 29).

Εικόνα 29. Διάγραμμα ενίσχυσης μεταγράφων HER-3 από την αντίδραση βελτιστοποίησης ιχνηθέτη

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο HER-3

Η αντίδραση για το HER-3 έγινε με βάση τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτή. Τα συστατικά της κάθε αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 7. Για την εξασφάλιση εγκυρότητας της τεχνικής, HT-29 cDNA (όπως παραπάνω) χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόρφωση τυπικής καμπύλης, βάση της οποίας έγινε η μέτρηση της αποτελεσματικότητας (efficiency) της αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου HER-3 στα δείγματα. Επτά διαφορετικές ποσότητες cDNA αντιστοιχούσαν σε επτά διαφορετικά σημεία της τυπικής καμπύλης (0.2, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 μg) (εικόνα 30). Οι

αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της πλατφόρμας MX3000p (Stratagene, La Jolla, USA) υπό τις εξής συνθήκες: αρχικά, 10' στους 95°C με σκοπό την ενεργοποίηση του ενζύμου DNA πολυμεράση, και έπειτα 45 κύκλοι τριών επιμέρους σταδίων α) 30'' στους 95°C (αποδιάταξη DNA), β) 1' στους 60 °C (πρόσδεση εκκινητών) και γ) 30'' στους 72°C (σύνθεση DNA). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του HER-3 υπολογίστηκαν με βάση τον κύκλο της αντίδρασης, στον οποίο ανιχνεύθηκε ικανή ποσότητα φθορισμού. Η κανονικοποίηση ως προς τον κύκλο της αντίδρασης βασίστηκε στα δείγματα αναφοράς (calibrators). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε τριπλέτα αντιδράσεων, για την εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, μια τριπλέτα αντιδράσεων έγινε δίχως προσθήκη cDNA, ως αρνητικός μάρτυρας.

Εικόνα 30. Τυπική καμπύλη για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου HER-3

Η κανονικοποίηση των επιπέδων HER-3 έγινε με βάση την έκφραση των επαναλαμβανομένων αλληλουχιών Alu-sq (ως «γονίδιο» αναφοράς) (Dr Vandesompele, Gent University Hospital, Belgium). Αυτές εκφράζονται σταθερά σε φυσιολογικό

βλεννογόνο παχέος εντέρου αλλά και σε αδενοκαρκινώματα διαφορετικών σταδίων και βαθμών διαφοροποίησης (Άννα Αντωνακοπούλου, Εργαστήριο Κλινικής Ογκολογίας).

Πίνακας 7. Συστατικά αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου HER-3 σε υπό μελέτη δείγματα, calibrator και δείγματα τυπικής καμπύλης

Συστατικά	Δείγματα υπό μελέτη/calibrator	Δείγματα τυπικής καμπύλης
H ₂ O	6.75 μl	4.95 μl
10X buffer	2.5 μl	2.5 μl
MgCl ₂	2.5 μl	2.5 μl
dNTPs	1 μl	1 μl
frw primer	2.25 μl	2.25 μl
rev primer	0.75 μl	0.75 μl
dye (1:500)	0.375 μl	0.375 μl
Sure start	0.25 μl	0.25 μl
probe (1:100)	5.43 μl	5.43 μl
cDNA	3.2 μl	5 μl

10X buffer: ρυθμιστικό διάλυμα, Sure start: DNA πολυμεράση

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία Alu-sq

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της αλληλουχίας Alu-sq πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με βάση τη χρωστική SYBR Green I χρησιμοποιώντας το ολοκληρωμένο σύστημα αντιδραστηρίων Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, La Jolla, USA). Τα συστατικά της αντίδρασης για την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία Alu-sq φαίνονται στον πίνακα 8. Αντίστοιχα, HT-29

cDNA χρησιμοποιήθηκε και εδώ για τη διαμόρφωση τυπικής καμπύλης βάση της οποίας έγινε η μέτρηση της έκφρασης cDNA των δειγμάτων. Η κανονικοποίηση βασίστηκε στα δείγματα αναφοράς (calibrators). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε τριπλέτα αντιδράσεων, για την εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, μια τριπλέτα αντιδράσεων έγινε δίχως προσθήκη cDNA, ως αρνητικός μάρτυρας.

Οι αντιδράσεις περιείχαν 5-carboxy-x-rhodamine (ROX) ως παθητική χρωστική αναφοράς και cDNA που αντιστοιχούσε σε 100 ng ολικού RNA.

Πίνακας 8. Συστατικά αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της αλληλουχίας Alu-sq σε υπό μελέτη δείγματα, calibrator και δείγματα τυπικής καμπύλης

Συστατικά	Δείγματα υπό μελέτη/calibrator	Δείγματα τυπικής καμπύλης
H ₂ O	7.425 μl	5.625 μl
MM	12.5 μl	12.5 μl
frw primer	0.75 μl	0.75 μl
rev primer	0.75 μl	0.75 μl
dye (1:500)	0.375 μl	0.375 μl
cDNA	3.2 μl	5 μl

MM: ρυθμιστικό διάλυμα με DNA πολυμεράση, dNTPs, MgCl₂, SYBR green

Αξιολόγηση αποτελεσμάτων RT-PCR

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HER-3 υπολογίστηκαν με βάση τον κύκλο της αντίδρασης, στον οποίο ανιχνεύθηκε ικανή ποσότητα φθορισμού και η κανονικοποίηση ως προς τον κύκλο της αντίδρασης βασίστηκε στα δείγματα αναφοράς (calibrators). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αλγόριθμος: $\psi = -\alpha \log \chi + \beta$, όπου ψ = σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίου βάση τυπικής καμπύλης, χ = κύκλος αντίδρασης, στον οποίο ανιχνεύθηκε ικανή ποσότητα φθορισμού, α και β ειδικές σταθερές. Η σταθερά β αντιπροσωπεύει το σημείο στο οποίο η τυπική καμπύλη τέμνει τον άξονα ψ και η σταθερά α είναι η κλίση της καμπύλης που σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης (efficiency). Η ποσότητα που υπολογίστηκε στη συνέχεια κανονικοποιήθηκε σε σχέση με την έκφραση του calibrator (ψ') ως εξής: ψ/ψ' (HER-3). Η κανονικοποιημένη σχετική αυτή ποσότητα τελικώς κανονικοποιήθηκε περαιτέρω ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς Alu-sq και το κλάσμα αυτό (HER-3/Alu-sq) χρησιμοποιήθηκε για στατιστική ανάλυση και εξαγωγή συμπερασμάτων.

Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μια μέθοδο κατά την οποία ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται προκειμένου να συνδέσει ειδικά κάποιο ιστικό αντιγόνο με μια χρώση, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος παραλλαγών, σε ότι αφορά τον τύπο του ιστικού δείγματος, τις συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος και του συστήματος ανίχνευσης. Οι τομές που χρησιμοποιούνται «κόβονται» από αντίστοιχα μπλοκ ιστικών δειγμάτων, τα οποία έχουν υποστεί μονιμοποίηση με φορμαλδεϋδη, μια χημική ένωση που γίνεται καλά ανεκτή από τους ιστούς και έχει μεγάλη διεισδυτικότητα [144]. Ο στόχος είναι η διατήρηση του

ιστού σε κατάσταση παρόμοια με την έμβια, και η προστασία του από τις δυσμενείς συνθήκες της επεξεργασίας και πειραματικής μεθόδου. Η παρασκευή τομών του υλικού πραγματοποιείται με εμπέδωση σε κύβους παραφίνης, μέθοδος που συνήθως εξασφαλίζει πολύ καλή μορφολογική λεπτομέρεια και ανάλυση των τομών.

Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η πιθανή αλλοίωση αντιγονικών επίτοπων. Συγκεκριμένα, κατά τη μονιμοποίηση των τομών ιστού σε φορμόλη, τα περισσότερα αντιγόνα υφίστανται σημαντική βλαπτική επίδραση, που οδηγεί σε κάλυψή τους και αλλαγή της σύστασης/διαμόρφωσής τους [145]. Με δεδομένο ότι η ανοσοιστοχημεία στηρίζεται στη σύνδεση χρησιμοποιούμενου αντισώματος με ενδογενές ειδικό αντιγονικό επίτοπο, σημαντικό στάδιο της μεθόδου αποτελεί η «ανάκτηση» αντιγόνου. Η διαδικασία αυτή περιγράφει ένα σύνολο τεχνικών που μεγιστοποιούν τη διαθεσιμότητα ενός ιστικού αντιγόνου προκειμένου να αλληλεπιδράσει με το ειδικό αντίσωμα. Οι δύο πιο συνηθισμένες τεχνικές είναι η ενζυμική πέψη και η θέρμανση. Στην προκειμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θέρμανσης τομών ιστού, εμβαπτισμένων σε ρυθμιστικά διαλύματα με κατάλληλο pH [διάλυμα κιτρικού (pH=6) ή καυστικού νατρίου (pH=8)], σε κλίβανο μικροκυμάτων. Αναλυτικότερα, μηχανισμοί ανάκτησης αντιγόνου μέσω θέρμανσης περιλαμβάνουν, διάσπαση cross-linking δεσμών που έχουν σχηματιστεί από τη δράση της φορμαλδεΐδης ανάμεσα στους αντιγονικούς επίτοπους και λοιπές μη ειδικές πρωτείνες, εκχύλιση των πρωτεϊνών με ικανότητα διάχυσης, που εμποδίζουν την πρόσβαση στις ειδικές αντιγονικές θέσεις, κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, επανυδάτωση των τομών, η οποία επιτρέπει μεγαλύτερη διείσδυση του αντισώματος και αυξημένη προσέγγιση στους επίτοπους [146]. Το αποτέλεσμα της θέρμανσης των ιστών στην ανάκτηση του αντιγόνου συσχετίζεται θετικά με το γινόμενο της θερμοκρασίας στην

οποία παραμένουν οι τομές επί το χρόνο παραμονής. Συνήθως, υψηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε καλύτερα αποτελέσματα [144]. Στην παρούσα μελέτη, οι τομές θερμάνθηκαν σε υψηλές τιμές ισχύος κλιβάνου μικροκυμάτων, για μικρά χρονικά διαστήματα.

Με τη χρήση μικροτόμου, λήφθηκαν τομές πάχους 4μm, οι οποίες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, ειδικά φορτισμένες με θετικό φορτίο, που έχει αποτέλεσμα την ισχυρή σύνδεση μεταξύ τομών ιστού και αντικειμενοφόρου. Οι τομές ιστών, πριν αρχίσει η διαδικασία της σήμανσης με το ειδικό αντίσωμα, υφίστανται αποπαραφίνωση με θέρμανση, εμβάπτισή τους σε ξυλόλη και ενυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης σταδιακά μειούμενης συγκέντρωσης. Στη συνέχεια, η δραστητικότητα ενδογενούς υπεροξειδάσης του ιστού καταστέλλεται με κορεσμό του ενζύμου μέσω προσθήκης H_2O_2 . Αυτό το στάδιο είναι αναγκαίο για την αποφυγή μη ειδικού σήματος, διότι το σύστημα ανίχνευσης του αντισώματος που έχει προσδεθεί στους ιστούς, βασίζεται σε χημική αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση, το οποίο είναι τεχνητά συνδεδεμένο στο αντίσωμα.

Έπειτα, πραγματοποιείται επώαση των τομών με το ειδικό πρωτεύον αντίσωμα, το οποίο μπορεί να είναι είτε μονοκλωνικό είτε πολυκλωνικό. Η δεύτερη κατηγορία, περιλαμβάνει στο ίδιο διάλυμα πολλές υποομάδες αντισωμάτων που αντιδρούν με διαφορετικούς επίτοπους του ίδιου αντιγόνου. Οι μηχανισμοί κάλυψης, μέσω μονιμοποίησης, αλλά και ανάκτησης αντιγόνου, δεν είναι όμως δυνατό να επηρεάζουν όλους τους επίτοπους στον ίδιο βαθμό. Αντίθετα, τα μονοκλωνικά αντισώματα, που διαθέτουν μία μόνο δυνατότητα αντίδρασης με ένα συγκεκριμένο επίτοπο παρέχουν πολύ πιο σαφή αποτελέσματα. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων καθορίστηκαν με κριτήρια την εντονότερη δυνατή ειδική χρώση-«σήμα», σε συνδυασμό με χαμηλότερο «θόρυβο» (μη

ειδική χρώση background). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα TBS, που περιέχει 1% Bovine Serum Albumin (BSA), με σκοπό την αποφυγή μη ειδικής δέσμευσης του αντισώματος. Από τις δύο συνεχόμενες τομές που είχαν επικολληθεί σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα, μόνο η μία επώαστηκε με το πρωτεύον αντίσωμα, ενώ η άλλη, η οποία καλύφθηκε με TBS και υποβλήθηκε κανονικά σε όλα τα υπόλοιπα στάδια της τεχνικής, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, οι πηγές προέλευσης, οι αραιώσεις και η μέθοδος ανάκτησης αντιγόνου φαίνονται στον πίνακα 9. Πρέπει να αναφερθεί ότι το πρωτογενές αντίσωμα εναντίον του ER β , δεσμεύει την ισομορφή β 1.

Πίνακας 9. Μέθοδοι ανάκτησης αντιγόνου και χαρακτηριστικά αντισωμάτων

Αντιγόνο	Ανάκτηση αντιγόνου	Πρωτογενή αντισώματα
HER-3	15΄ σε 1mM EDTA-NaOH (pH=8.0)	rabbit polyclonal, 1:150, (sc-285, Santa Cruz, Ca, USA)
phosphoHER-3	15΄ σε 1mM EDTA-NaOH (pH=8.0)	rabbit monoclonal, 1:100, Tyr1289 (21D3, Cell Signaling Technology, USA)
ER α	15΄ σε 10mM διαλύματος κιτρικού (pH=6)	mouse monoclonal, 1:30, NCL-L-6F11, Novocastra, UK
ER β 1	15΄ σε 10mM διαλύματος κιτρικού (pH=6)	rabbit polyclonal, prediluted, AR385-5R, Biogenex, Ca, USA
AIB1	15΄ σε 1mM EDTA-NaOH (pH=8.0)	mouse monoclonal, 1:50, Clone 34, BD Biosciences, Ca. USA
TIF2	15΄ σε 1mM EDTA-NaOH (pH=8.0)	mouse monoclonal, 1:50, Clone 29, BD Biosciences, Ca, USA
PELP1/MNAR	μη απαιτούμενη	polyclonal, 1:700, Novus Biologicals, CO, USA

Προκειμένου να ανιχνευτούν τα αντισώματα που έχουν δεσμευτεί σε αντιγονικές θέσεις, είναι αναγκαίο να συνδεθεί σε αυτά με κάποια τεχνική το ένζυμο, ώστε με την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος, να παραχθεί στις ειδικές θέσεις το ορατό προϊόν. Άρα, επόμενο στάδιο καθίσταται η προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος, με τελικό σκοπό την ανίχνευση του πρωτογενούς αντισώματος που έχει δεσμευτεί στους ιστούς. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές ανίχνευσης είναι ο φθορισμός και η χρωμομετρική μέθοδος μέσω ενζύμου, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη μελέτη. Η τεχνική βασίζεται στη μετατροπή χρωμογόνου υποστρώματος από κάποιο ένζυμο προς έγχρωμο προϊόν, το οποίο κατακρημνίζεται. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν το ένζυμο υπεροξειδάση (Peroxidase) και το χρωμογόνο υπόστρωμα διάμινο-βενζιδίνη (Diaminobenzidine/ DAB), που καταλήγουν στην παραγωγή προϊόντος αδιάλυτου στην αιθανόλη και χρώματος καφέ, το οποίο εντοπίζεται στο οπτικό μικροσκόπιο.

Με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε σύστημα ενίσχυσης-ανίχνευσης, το οποίο αυξάνει σημαντικά την αναλογία σήματος προς αντίσωμα. Ειδικότερα, εφαρμόστηκε το σύστημα EnVision (Dako), όπου το δευτερεύον αντίσωμα είναι συνδεδεμένο σε σύμπλεγμα από μεγαλομόριο δεξτράνης, που φέρει μεγάλο αριθμό μορίων ενζύμου (Εικόνα 31). Επομένως, σε ένα μόριο πρωτεύοντος αντισώματος αντιστοιχούν πολλά μόρια υπεροξειδάσης, με συνέπεια ισχυρότερη αντίδραση παραγωγής έγχρωμου προϊόντος. Το πλεονέκτημα του συγκεκριμένου συστήματος ανίχνευσης είναι η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς και η εκτέλεσή τους σε δύο μόνο στάδια, σε σχέση με άλλες μεθόδους που απαιτούν τρία, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή αυστηρότερων μεθοδολογικών προτύπων.

Τελικό στάδιο αποτελεί η τοποθέτηση των τομών σε αιματοξυλίνη, για την αντίθετη μπλε χρώση των πυρήνων, η αφυδάτωσή τους σε άνοδο διαλυμάτων αιθανόλης, η εμβάπτισή τους σε ξυλόλη και η επικάλυψή τους με καλυπτρίδα.

Εικόνα 31. Σύστημα ανίχνευσης πρωτογενούς αντισώματος με σύστημα EnVision

Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Κάθε τομή εκτιμήθηκε και αξιολογήθηκε χωριστά και ανεξάρτητα από δυο ανεξάρτητους παρατηρητές. Διαφορές ανάμεσα στις εκτιμήσεις σπάνια αναφέρθηκε και επιλύθηκε με επιπρόσθετη ταυτόχρονη εκτίμηση της τομής από τους δυο εκτιμητές και συζήτηση με στόχο την επίτευξη συμφωνίας. Περιοχές με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση θετικών κυττάρων επιλέχθηκε σε χαμηλή μεγέθυνση (x40). Ο αριθμός των θετικών κυττάρων και ο ολικός αριθμός των κυττάρων καθορίστηκε με επισκόπηση έξι διαφορετικών πεδίων ανά τομή σε 400x μεγέθυνση. Για κάθε πεδίο, το ποσοστό θετικών κυττάρων μετρήθηκε και ο μέσος όρος αυτών υπολογίστηκε. Η ένταση της χρώσης επίσης εκτιμήθηκε και αξιολογήθηκε ως 1+ (ασθενής), 2+ (μέτρια) and 3+ (ισχυρή).

HER-3 και pHER-3

Η κυτταροπλασματική και πυρηνική χρώση του HER-3 αξιολογήθηκε χωριστά. Για την κυτταροπλασματική χρώση HER-3, μέτρια και ισχυρή χρώση (2+ και 3+) χαρακτηρίστηκε ως υπερέκφραση. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην ένταση της

πυρηνικής χρώσης και μόνο τομές με > 25% κυττάρων θετικών για πυρηνικό HER-3 θεωρήθηκαν θετικές. Χρώση φωσφορυλιωμένου HER-3 (pHER-3) παρατηρήθηκε στον πυρήνα των κυττάρων και τομές με > 5% θετικών κυττάρων θεωρήθηκαν θετικές. Μεμβρανική χρώση pHER-3 θεωρήθηκε θετική όταν >1% των κυττάρων παρουσίασαν χρώση pHER-3 στην κυτταρική τους μεμβράνη.

ER α και ER β

Η έκφραση ER α ήταν πυρηνική, αλλά σπάνια (<1% επιθηλιακών κυττάρων). Η έκφραση του ER β ήταν πυρηνική και συχνή. Το % ποσοστό θετικών κυττάρων πολλαπλασιάστηκε με την ένταση χρώσης (X1 ή X2 ή X3) και μια τιμή αντιπροσωπευτική για την πυρηνική έκφραση του ER β , για κάθε τομή/ασθενή υπολογίστηκε (εύρος: 0-300). Για να υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης με προηγούμενες ανοσοιστοχημικές μελέτες του ER β στον καρκίνο παχέος εντέρου [103, 147-149] ποσοστό θετικών κυττάρων >10% με ισχυρή ένταση χρώσης, που αντιστοιχεί σε τιμή >30 θεωρήθηκε θετική για την έκφραση του ER β .

AIB1 TIF2 και PELP1/MNAR

Οι συνενεργοποιητές AIB1, TIF2 και PELP1/MNAR εντοπίστηκαν στον πυρήνα. Το % ποσοστό θετικών κυττάρων πολλαπλασιάστηκε με την ένταση χρώσης (X1 ή X2 ή X3) και μια τιμή αντιπροσωπευτική για την πυρηνική έκφραση κάθε πρωτεΐνης, για κάθε τομή/ασθενή υπολογίστηκε (εύρος: 0-300). Ποσοστό κυττάρων >10% με ισχυρή ένταση χρώσης, αντιστοιχώντας σε τιμή >30 θεωρήθηκε θετική για την έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης. Για λόγους στατιστικής ανάλυσης, τιμές έκφρασης AIB1, TIF2 και PELP1/MNAR μεγαλύτερες ή ίσες με τη διάμεση (median) τιμή έκφρασης (170, 240 και 170 αντίστοιχα) θεωρήθηκε ως υπερέκφραση.

Στατιστική ανάλυση

Συγκριτικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με στόχο τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ κλινικοπαθολογικών παραμέτρων και επιπέδων έκφρασης του γονιδίου και της πρωτεΐνης HER-3, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλιωμένης μορφής (pHER-3). Σε ότι αφορά συνεχείς μεταβλητές (continuous or ordinal variables), χρησιμοποιήθηκαν δύο μη παραμετρικά τεστ, το Kruskal-Wallis test για >2 ανεξάρτητα δείγματα και το Mann-Whitney test για 2 ανεξάρτητα δείγματα. Σε ό,τι αφορά διχοτομικές μεταβλητές, χρησιμοποιήθηκε το Chi square test. Λόγω συγκρίσεων μεταξύ πολλαπλών κατηγοριών, αυτά τα τεστ ακολουθήθηκαν από post-hoc Bonferroni test, με στόχο την επιβεβαίωση επιμέρους συσχετίσεων. Συγκρίσεις μεταξύ σχετιζόμενων δειγμάτων, π.χ φυσιολογικού βλεννογόνου, αδενώματος και αδenoκαρκινώματος του ίδιου ασθενή πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Wilcoxon paired samples test. Το Spearman rank correlation test χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ HER-3 πρωτεΐνης και επιπέδων mRNA και μεταξύ επιπέδων HER-3 και pHER-3 στο ίδιο ιστικό δείγμα. Το Kaplan-Meier procedure χρησιμοποιήθηκε για συγκρίσεις μεταξύ επιπέδων έκφρασης HER-3 και χρονικού διαστήματος μέχρι υποτροπή της νόσου αλλά και συνολικής επιβίωσης. Το Cox hazard regression model επιστρατεύτηκε για την εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας των επιπέδων έκφρασης του HER-3 πάντα σε σχέση με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS (SPSS®, Release 14.0.1, Chicago, IL, USA). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως p -value <0.05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η πρωτεΐνη HER-3 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδеноκαρκινώματα και φαίνεται να μεταβάλλεται τοπογραφικά κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του HER-3 και της φωσφορυλιωμένης μορφής του, η έκφραση της πρωτεΐνης αρχικά εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε 119 αδеноκαρκινώματα, 110 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου και 24 αδενώματα. Η πρωτεΐνη HER-3 ανιχνεύτηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων και εκτιμήθηκε χωριστά στα δύο αυτά διαμερίσματα, ενώ ξεκάθαρη πλήρης μεμβρανική χρώση HER-3 δεν παρατηρήθηκε.

Η κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 ανιχνεύτηκε σε άνω του >50% των επιθηλιακών κυττάρων τόσο σε δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου όσο και σε αδενώματα και αδеноκαρκινώματα. Τα αποτελέσματα σε ό,τι αφορά στην ένταση της κυτταροπλασματικής χρώσης παρατίθενται στον πίνακα 10. Όταν μετρήθηκε ημιποσοτικά, η κυτταροπλασματική χρώση HER-3 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο φυσιολογικό βλεννογόνο σε σχέση με τα αδενώματα ($p<0.0001$), αλλά και τα αδеноκαρκινώματα ($p<0.0001$). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κυτταροπλασματική έκφραση του HER-3 ανάμεσα σε αδενώματα και αδеноκαρκινώματα ($p=0.088$).

Πυρηνική χρώση HER-3 ανιχνεύτηκε σε 90/110 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου (81.8%), σε 13/24 αδενώματα (54.2%) και σε 27/119 αδеноκαρκινώματα

(22.7%). Η πυρηνική χρώση HER-3 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου συγκριτικά με αδενώματα ($p=0.033$) και αδеноκαρκινώματα ($p<0.0001$). Επίσης, ήταν σημαντικά υψηλότερη σε αδενώματα σε σχέση με αδеноκαρκινώματα ($p=0.01$).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα έντασης κυτταροπλασματικής χρώσης HER-3

Τύπος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων n	Ασθενής χρώση n (%)	Μέτρια χρώση n (%)	Ισχυρή χρώση n (%)
Φυσιολογικός βλεννογόνο	110	23 (20.9%)	57 (51.8%)	30 (27.3%)
Αδενώματα	24	1 (4.2%)	8 (33.4%)	15 (62.4%)
Αδеноκαρκινώματα	119	25 (21%)	61 (51.3%)	33 (27.7%)

Τόσο σε δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου όσο και σε αδеноκαρκινώματα η κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 συσχετίστηκε σημαντικά με την πυρηνική έκφραση ($r=0.348$, $p<0.0001$ και $r=0.241$, $p=0.008$, αντίστοιχα). Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την κυτταροπλασματική και πυρηνική έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 φαίνονται στην εικόνα 32.

Η έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 σε αδеноκαρκινώματα δε φαίνεται να συσχετίζεται σημαντικά με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε την παρουσία σημαντικής συσχέτισης μεταξύ κυτταροπλασματικής ή πυρηνικής έκφρασης της πρωτεΐνης HER-3 σε αδеноκαρκινώματα και διαφόρων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων της νόσου, όπως φαίνεται στον πίνακα 11. Σε ό,τι αφορά στην κυτταροπλασματική χρώση, ο στατιστικός έλεγχος έγινε μεταξύ αδеноκαρκινωμάτων που υπερέκφραζαν HER-3 σε σχέση με εκείνα που δεν υπερέκφραζαν, διότι κυτταροπλασματική έκφραση παρατηρήθηκε σε

όλα. Επίσης, η πυρηνική έκφραση και η κυτταροπλασματική υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-3 σε αδενοκαρκινώματα δε συσχετίστηκαν σημαντικά με το χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου, με την πιθανότητα υποτροπής ή θανάτου και με τη συνολική επιβίωση των ασθενών (εικόνα 33).

Πίνακας 11. Έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 σε αδενοκαρκινώματα και κλινικοπαθολογικές παραμέτροι της νόσου.

<i>n</i> =119	Κυτταροπλασματικό HER-3		<i>P</i> value	Πυρηνικό HER-3		<i>P</i> value
	(+)* ¹ <i>n</i> =103	(-)* ¹ <i>n</i> =16		(+)* ² <i>n</i> =27	(-)* ² <i>n</i> =92	
Στάδιο κατά Duke's						
B 44	38	6	0.99	12	32	0.27
C 68	59	9		15	53	
D 7	6	1		0	7	
Βαθμός διαφοροποίησης						
I 21	18	3	0.90	3	18	0.36
II 87	75	12		20	67	
III 11	10	1		4	7	
Φύλο						
άνδρες 77	65	12	0.35	17	60	0.83
γυναίκες 42	38	4		10	32	
Ιστολογικός τύπος						
μη βλεννώδη 107	93	14	0.73	24	83	0.84
βλεννώδη 12	10	2		3	9	
Θέση όγκου						
δεξιό κόλον 31	25	6	0.51	7	24	0.84
αριστερό κόλον 49	43	6		10	39	
ορθό 39	35	4		10	29	
Ηλικία διάμεση (εύρος)	67 (30-90)	65.5 (44-79)	0.65	66(30-77)	67(40-90)	0.53

*¹ Κυτταροπλασματική έκφραση HER-3: (+): υπερέκφραση, (-): όχι υπερέκφραση

*² Πυρηνική έκφραση HER-3: (+): θετική έκφραση, (-):αρνητική έκφραση

Εικόνα 32. (Α) Πυρηνική έκφραση pHER-3 σε αδеноκαρκίνωμα. (Β) Μεμβρανική έκφραση pHER-3 σε αδеноκαρκίνωμα. (C) Πυρηνική και ασθενής κυτταροπλασματική έκφραση HER-3 σε φυσιολογικό βλεννογόνο. (D) Κυτταροπλασματική έκφραση HER-3 σε αδένωμα. (Ε, F) Κυτταροπλασματική και αραιή πυρηνική (βέλη) έκφραση HER-3 σε αδеноκαρκινώματα. (Α-F: x400)

Εικόνα 33. Κυτταροπλασματική (υπερ)έκφραση HER-3 σε αδενοκαρκινώματα και πενταετής επιβίωση ασθενών (log rank test: $p=0.64$)
(high: υπερέκφραση, low: όχι υπερέκφραση cut-off: διάμεση τιμή κυτταροπλασματικής έκφρασης)

Η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης HER-3 (pHER-3) εκφράζεται στον πυρήνα και τη μεμβράνη επιθηλιακών και λείων μυικών κυττάρων παχέος εντέρου σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδеноκαρκινώματα

Μεμβρανική ανοσοχρώση επιθηλιακών κυττάρων για το pHER-3 ανιχνεύτηκε σε 7/110 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου (6.3%), 10/24 αδενώματα (41.7%) και 10/119 αδеноκαρκινώματα (8.4%). Λόγω της μεγάλης ετερογένειας και μη σταθερής εμφάνισης σε όλα τα θετικά δείγματα, δε συμπεριλήφθηκε στη στατιστική ανάλυση.

Η πυρηνική ανοσοχρώση επιθηλιακών κυττάρων για το pHER-3 ήταν ομοιογενής και σταθερή στα θετικά δείγματα. Θετική χρώση ($\geq 5\%$ ποσοστό κυττάρων με πυρηνικό pHER-3) παρατηρήθηκε σε 22/110 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου (20%), σε 12/24 αδενώματα (50%) και σε 27/119 (22.7%) αδеноκαρκινώματα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην πυρηνική έκφραση του pHER-3, μεταξύ φυσιολογικού βλεννογόνου, αδενωμάτων και αδеноκαρκινωμάτων. Ωστόσο, τάση αυξημένης έκφρασης παρατηρήθηκε στα αδενώματα σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο ($p=0.057$). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη μεμβρανική και πυρηνική έκφραση της πρωτεΐνης pHER-3 επιθηλιακών κυττάρων παρουσιάζονται παραπάνω. Αξιοσημείωτα, ανοσοχρώση για το pHER-3 παρατηρήθηκε επαναλαμβανόμενα σε λεία μυικά κύτταρα φυσιολογικού ιστού, αδενωμάτων και αδеноκαρκινωμάτων (εικόνα 34).

Η πυρηνική έκφραση pHER-3 συσχετίζεται σημαντικά με το στάδιο της νόσου, χωρίς να συσχετίζεται με την έκφραση της μη φωσφορυλιωμένης μορφής

Τα επίπεδα έκφρασης του πυρηνικού pHER-3 διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε αδеноκαρκινώματα σταδίου B και σταδίου D ($p=0.011$), με σαφώς πιο συχνή έκφραση στα δεύτερα. Συγκεκριμένα, 4/7 (57.1%) αδеноκαρκινώματα σταδίου D εξέφραζαν την

πρωτεΐνη σε σχέση με μόλις 7/46 (15.2%) αδενοκαρκινώματα σταδίου Β. Ωστόσο, η έκφραση του πυρηνικού pHER-3 δε συσχετίστηκε με τις υπόλοιπες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (πίνακας 12), με το χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου και με την πιθανότητα υποτροπής ή θανάτου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 35, ασθενείς με αδενοκαρκινώματα που εκφράζουν πυρηνικό pHER-3 παρουσιάζουν ελαφρά μειωμένη συνολική επιβίωση σε σχέση με ασθενείς με pHER-3 αρνητικά αδενοκαρκινώματα. Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (log rank test: $p=0.45$). Επίσης, δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης πυρηνικού pHER-3 και σε εκείνα κυτταροπλασματικού ή πυρηνικού HER-3 τόσο σε φυσιολογικό βλεννογόνο, όσο σε αδενώματα ή αδενοκαρκινώματα.

Πίνακας 12. Κλινικοπαθολογικές παράμετροι και έκφραση πυρηνικού pHER-3 σε αδενοκαρκινώματα
*¹ (+): θετική έκφραση, (-): αρνητική έκφραση)

<i>n</i> = 119		pHER-3		<i>P</i> value
Στάδιο κατά Duke's		(+)* ¹ <i>n</i> =27	(-)* ¹ <i>n</i> =92	
B	46	7	39	0.043
C	66	16	50	
D	7	4	3	
Βαθμός διαφοροποίησης				0.17
I	20	4	16	
II	88	18	70	
III	11	5	6	0.31
Φύλο				
άνδρες	76	15	61	
γυναίκες	43	12	31	0.21
Ιστολογικός τύπος				
μη βλεννώδη	107	26	81	
βλεννώδη	12	1	11	0.21
Θέση όγκου				
δεξιό κόλον	33	5	28	
αριστερό κόλον	49	15	34	
ορθό	37	7	30	
Ηλικία διάμεση (εύρος)		70 (50-90)	66.5 (30-83)	0.06

Εικόνες 34. Θετική ανοσοχρώση pHER-3 σε λεία μυϊκά κύτταρα αδενοκαρκινωμάτων

Εικόνα 35. Πυρηνική έκφραση pHER-3 σε αδενοκαρκινώματα και συνολική επιβίωση ασθενών. (+): θετική έκφραση, (-): αρνητική έκφραση, cut-off: 5% θετικών κυττάρων

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HER-3 δε φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά κατά την καρκινογένεση, αλλά στα αδενοκαρκινώματα σχετίζονται με λεμφαδενική διήθηση, ηλικία, θέση όγκου και πιθανότητα υποτροπής

Με τη χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του γονιδίου HER-3 διερευνήθηκαν σε 54 αδενοκαρκινώματα and 29 αντίστοιχα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Τα επίπεδα έκφρασης HER-3 mRNA πάντα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης Alu-sq RNA (HER-3 mRNA/ Alu-sq RNA) στα αδενοκαρκινώματα παρουσίασαν εύρος τιμών από 0.0115 ως 0.1714 με διάμεση τιμή 0.0355. Στα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου το εύρος τιμών ήταν από 0.012 to 0.338 με διάμεση τιμή 0.0411. Δηλαδή, τα επίπεδα HER-3 mRNA δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα αδενοκαρκινώματα και στα αντίστοιχα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου ($p=0.159$). Ωστόσο, αυξημένα επίπεδα HER-3 mRNA στα αδενοκαρκινώματα συσχετίστηκαν με λεμφαδενική διήθηση. Συγκεκριμένα, η διάμεση τιμή επιπέδων έκφρασης HER-3 mRNA σε αδενοκαρκινώματα με διηθημένους λεμφαδένες ήταν σαφώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε αδενοκαρκινώματα χωρίς διηθημένους λεμφαδένες (0.043694 έναντι 0.026406, αντίστοιχα, $p=0.016$).

Για λόγους στατιστικής ανάλυσης, στα αδενοκαρκινώματα, τιμές επιπέδων έκφρασης μεγαλύτερες από τη διάμεση τιμή θεωρήθηκαν υπερέκφραση και τιμές χαμηλότερες από τη διάμεση θεωρήθηκαν χαμηλή έκφραση. Η διάμεση ηλικία ασθενών με αδενοκαρκινώματα με υπερέκφραση HER-3 mRNA ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη εκείνων με χαμηλή έκφραση (71 έναντι 64 έτη, $p=0.016$). Επιπλέον, χαμηλή έκφραση HER-3 mRNA συσχετίστηκε με αδενοκαρκινώματα δεξιού κόλου συγκριτικά

με αδενοκαρκινώματα αριστερού κόλου και ορθού ($p=0.013$). Συγκεκριμένα, μόνο 3/14 (21.4%) αδενοκαρκινώματα δεξιού κόλου υπερέκφραζαν HER-3 mRNA συγκριτικά με 24/40 (60%) αδενοκαρκινώματα αριστερού κόλου και ορθού. Δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα HER-3 mRNA στα αδενοκαρκινώματα και τις υπόλοιπες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (πίνακας 13), με την πιθανότητα θανάτου και τη συνολική επιβίωση (εικόνα 36). Ωστόσο, αυξημένα επίπεδα HER-3 mRNA συσχετίστηκαν με χαμηλότερο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου (log rank test: $p=0.039$, εικόνα 37) και με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής. Συγκεκριμένα, ασθενείς με αδενοκαρκινώματα με υπερέκφραση HER-3 mRNA παρουσίασαν διπλάσιο ποσοστό υποτροπής της νόσου σε σχέση με εκείνα με χαμηλή έκφραση (59.2% έναντι 29.6%, $p=0.028$, πίνακας 14).

Επίσης, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου (mRNA) και της πρωτεΐνης HER-3 σε δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου και σε αδενοκαρκινώματα. Σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μόνο στα αδενοκαρκινώματα ανάμεσα στα επίπεδα mRNA και κυτταροπλασματικής HER-3 πρωτεΐνης ($r=0.334$, $p=0.031$), αλλά όχι και της πυρηνικής HER-3 πρωτεΐνης ($r=0.083$, $p=0.6$).

Πολυπαραγοντική ανάλυση με βάση το Cox proportional-hazards model, συμπεριλαμβανομένων όλων των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων και των επιπέδων έκφρασης γονιδίου και πρωτεΐνης HER-3 και pHER-3, έδειξε ότι το στάδιο ($p<0.001$) και ο βαθμός διαφοροποίησης ($p=0.004$) αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου.

Πίνακας 13. Κλινικοπαθολογικές παράμετροι και επίπεδα έκφρασης HER-3 mRNA στα αδενοκαρκινώματα

<i>n</i> =54		HER-3 mRNA		<i>P</i> value
Στάδιο κατά Duke's		(+)* ¹ <i>n</i> =27	(-)* ¹ <i>n</i> =27	
B	17	6	11	0.08
C	27	13	14	
D	10	8	2	
Βαθμός διαφοροποίησης				
I	13	6	7	0.48
II	34	16	18	
III	7	5	2	
Φύλο				
άνδρες	39	20	19	0.76
γυναίκες	15	7	8	
Ιστολογικός τύπος				
μη βλεννώδη	49	25	24	0.64
βλεννώδη	5	2	3	
Θέση όγκου				
δεξιό κόλον	14	3	11	0.046
αριστερό κόλον	25	15	10	0.013 (δεξιό vs αριστερό-ορθό)
ορθό	15	9	6	
Ηλικία διάμεση (εύρος)		71 (42-80)	64 (40-75)	0.016

*¹ (+): υπερέκφραση, (-): χαμηλή έκφραση

Πίνακας 14. Υπερέκφραση HER-3 mRNA στα αδενοκαρκινώματα και πιθανότητα υποτροπής της νόσου

		Υποτροπή		Σύνολο
		όχι	ναι	
HER3 m-RNA	Χαμηλή έκφραση	19	8	27
	Υπερέκφραση	11	16	27
	Σύνολο	30	24	54

Εικόνα 36. Καμπύλες Kaplan-Meier συνολικής επιβίωσης ασθενών με αδενοκαρκινώματα με (high) και χωρίς (low) υπερέκφραση HER-3 mRNA (log rank test, $p=0.23$)

Εικόνα 37. Καμπύλες Kaplan-Meier χρονικού διαστήματος ως την υποτροπή νόσου (TTP) ασθενών με αδενοκαρκινώματα με (+) και χωρίς (-) υπερέκφραση HER-3 mRNA (log rank test, $p=0.039$)

Ο ERα εκφράζεται σπάνια στο παχύ έντερο σε αντίθεση με τον ERβ, ο οποίος εκφράζεται συχνά στον πυρήνα επιθηλιακών αλλά και στρωματικών κυττάρων

Η έκφραση των πρωτεϊνών ERα, ERβ εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε 113 αδενοκαρκινώματα, 30 αδενώματα και 88 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Η έκφραση της πρωτεΐνης ERα παρατηρήθηκε σπάνια ($\leq 1\%$ επιθηλιακών κυττάρων) σε δύο δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, ένα αδένωμα και τρία αδενοκαρκινώματα (εικόνα 38) και δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για το συγκεκριμένο βιοδείκτη. Η πρωτεΐνη ERβ ανιχνεύτηκε στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε στον πυρήνα ενδοθηλιακών, φλεγμονωδών, λείων μυικών κυττάρων και μυοινοβλαστών. Η παρούσα μελέτη εστίασε στη διερεύνηση της έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα.

Από τα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, 82/88 (93.2%) εξέφραζαν την πρωτεΐνη ERβ, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στα αδενώματα και αδενοκαρκινώματα ήταν 30/30 (100%) και 101/113 (89.4%). Οι διάμεσες τιμές έκφρασης και οι τυπικές αποκλίσεις της ανοσοϊστοχημικά ανιχνευόμενης έκφρασης ERβ σε δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, αδενώματα και αδενοκαρκινώματα παρουσιάζονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15. Διάμεσες τιμές έκφρασης και οι τυπικές αποκλίσεις (TA) πρωτεΐνης ERβ

	ERβ Διάμεση (TA)
Φυσιολογικός βλεννογόνος	170 (51.7)
Αδενώματα	180 (19.4)
Αδενοκαρκινώματα	180 (62.8)

Εικόνα 38. Ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη ERα με σπάνια θετικά επιθηλιακά κύτταρα

Η έκφραση της πρωτεΐνης ERβ καθίσταται πιο έντονη κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης σε άνδρες, και στα αδενοκαρκινώματα συσχετίζεται με την πιθανότητα υποτροπής

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ERβ ήταν σημαντικά χαμηλότερα στο φυσιολογικό βλεννογόνο σε σχέση με αδενώματα ($p=0.01$) αλλά και αδενοκαρκινώματα ($p<0.02$). Σε ανάλυση υποπληθυσμών με βάση το φύλο, το εύρημα επιβεβαιώθηκε σε άνδρες ($p<0.05$ και $p=0.01$, αντίστοιχα), αλλά όχι σε γυναίκες ($p>0.05$) (εικόνα 39A). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ERβ δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε αδενώματα και αδενοκαρκινώματα ($p=0.46$). Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση ERβ στα αδενοκαρκινώματα και σε υπό εξέταση κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (πίνακας 16), συμπεριλαμβανομένης της συνολικής επιβίωσης και της πιθανότητας θανάτου. Ωστόσο, αδενοκαρκινώματα θετικά ως προς την έκφραση πρωτεΐνης ERβ παρουσίασαν μικρότερο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου (log rank test: $p=0.03$, εικόνα 39B) και αυξημένη πιθανότητα για υποτροπή συγκριτικά με ERβ αρνητικά αδενοκαρκινώματα (43% έναντι 8.3%, $p=0.02$). Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την πυρηνική έκφραση πρωτεΐνης ERβ παρουσιάζονται στις εικόνες 40, 41.

Πίνακας 16 α. Κλινικοπαθολογικές παράμετροι και έκφραση πρωτεΐνης ERβ στα αδενοκαρκινώματα

$n = 113$		ERβ		<i>P</i> value
		(-) $n = 12$	(+) $n = 101$	
Στάδιο κατά Duke's				
B	44	5	39	0.68
C	63	7	56	
D	6	0	6	
Βαθμός διαφοροποίησης				
I	21	1	20	0.59
II	81	10	71	
III	11	1	10	
Φύλο				
άνδρες	71	6	65	0.33
γυναίκες	42	6	36	
Ιστολογικός τύπος				
μη βλεννώδη	101	12	89	0.2
βλεννώδη	12	0	12	
Θέση όγκου				
δεξιό κόλον	31	3	28	0.73
αριστερό κόλον	45	6	39	
ορθό	37	3	34	
Ηλικία διάμεση (εύρος)		66 (45-77)	66 (30-90)	0.56

β. TNM στάδιο και έκφραση πρωτεΐνης ERβ στα αδενοκαρκινώματα

	ER β		<i>P</i> value
	(-) $n = 12$	(+) $n = 101$	
T στάδιο			
T1	0	0	0.19
T2	0	13	
T3	12	79	
T4	0	9	
N στάδιο			
N0	5	39	0.57
N1	6	36	
N2	1	26	
M στάδιο			
M0	12	95	0.38
M1	0	6	

Εικόνα 39. Α. Διάμεσες τιμές έκφρασης πρωτεΐνης ERβ σε άνδρες και γυναίκες
Β. Έκφραση πρωτεΐνης ERβ και χρονικό διάστημα ως την υποτροπή (TTP)

Εικόνα 40. (×400) **A.** Μέτρια έκφραση ERβ σε επιθηλιακά κύτταρα φυσιολογικού βλεννογόνου (βέλος). Θετικά λεμφοκύτταρα στο βασικό υμένα (μικρό βέλος). **B, C.** Ισχυρή έκφραση ERβ στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων (βέλη) αδενώματος (B) και αδеноκαρκινώματος (C). Κύτταρο σε διαδικασία μίτωσης με θετική χρώση (βέλος-C)

Εικόνα 41 (X400) **A.** Μέτρια ανοσοχρώση πρωτεΐνης ERβ σε επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα σε φυσιολογικό βλεννογόνο. **B.** Ισχυρή πυρηνική έκφραση πρωτεΐνης ERβ σε αδένωμα. Η πρωτεΐνης ERβ εκφράζεται και σε μιτωτικά κύτταρα. **C.** Ισχυρή πυρηνική έκφραση πρωτεΐνης ERβ σε αδеноκαρκίνωμα

Ο PELP1/MNAR ανιχνεύεται στον πυρήνα επιθηλιακών αλλά και στρωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου

Η έκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε 113 αδеноκαρκινώματα, 19 αδενώματα και 88 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Η πρωτεΐνη PELP1/MNAR ανιχνεύτηκε επαναλαμβανόμενα στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε στον πυρήνα ενδοθηλιακών, φλεγμονωδών, λείων μυικών κυττάρων και μυοινοβλαστών. Η παρούσα μελέτη εστίασε στη διερεύνηση της έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα.

Από τα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, 83/88 (94.3%) εξέφραζαν την πρωτεΐνη PELP1/MNAR, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στα αδενώματα και αδеноκαρκινώματα ήταν 19/19 (100%) και 106/113 (93.8%). Οι διάμεσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της έκφρασης PELP1/MNAR σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδеноκαρκινώματα φαίνονται στον πίνακα 17. Αξιοσημείωτα, έντονη ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη PELP1/MNAR παρατηρήθηκε στον πυρήνισκο επιθηλιακών κυττάρων, σε ορισμένα αδενώματα και αδеноκαρκινώματα. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την έκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR παρατίθενται στην εικόνα 42.

Πίνακας 17. Διάμεσες τιμές έκφρασης και τυπικές αποκλίσεις (TA) πρωτεΐνης PELP1/MNAR

	PELP1/MNAR Διάμεση (TA)
Φυσιολογικός βλεννογόνος	80 (47.3)
Αδενώματα	175 (46.5)
Αδеноκαρκινώματα	170 (68.9)

Η έκφραση του PELP1/MNAR αυξάνει κατά την καρκινογένεση και στα αδενοκαρκινώματα συσχετίζεται με την έκφραση του ERβ

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PELP1/MNAR ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε φυσιολογικό βλεννογόνο σε σχέση με αδενώματα ($p<0.01$) και αδενοκαρκινώματα ($p<0.01$). Σε ανάλυση υποπληθυσμών ως προς το φύλο, το εύρημα επιβεβαιώθηκε στους άνδρες ($p<0.01$, $p<0.01$, αντίστοιχα). Στις γυναίκες, τα επίπεδα έκφρασης PELP1/MNAR αυξήθηκαν σημαντικά από το φυσιολογικό βλεννογόνο στα αδενοκαρκινώματα ($p<0.01$), αλλά η αύξηση από το φυσιολογικό βλεννογόνο στα αδενώματα δεν ξεπέρασε τον ουδό στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.28$). Τα επίπεδα έκφρασης PELP1/MNAR δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε αδενώματα και αδενοκαρκινώματα ($p=0.62$).

Όταν αυτά τα ευρήματα συνδυάστηκαν με τα ανωτέρω σχετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης ERβ, βρέθηκαν τα εξής: από τα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου 80/88 (90.9%) εξέφραζαν και τις δύο πρωτεΐνες, 3/88 (3.4%) μόνο την πρωτεΐνη PELP1/MNAR, 2/88 (2.3%) μόνο την πρωτεΐνη ERβ, ενώ 3/88 (3.4%) ήταν αρνητικά και για τις δύο πρωτεΐνες. Από τα αδενοκαρκινώματα, 97/113 (85.8%) εξέφραζαν και τις δύο πρωτεΐνες, 4/113 (3.5%) μόνο την πρωτεΐνη ERβ, 9/113 (8%) μόνο την πρωτεΐνη PELP1/MNAR, ενώ 3/113 (2.7%) ήταν αρνητικά και για τις δύο πρωτεΐνες. Όλα τα αδενώματα εξέφραζαν και τις δύο πρωτεΐνες.

Στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ERβ και PELP1/MNAR στο φυσιολογικό βλεννογόνο και στα αδενώματα. Ωστόσο, ανέδειξε μέτρια αλλά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των δύο πρωτεϊνών στα αδενοκαρκινώματα ($r=0.19$, $p=0.048$).

Εικόνα 42 ($\times 400$). **A.** PELP1/MNAR στους πυρήνες επιθηλιακών κυττάρων (βέλη), λεμφοκυττάρων (μικρά βέλη) και ενδοθηλιακών κυττάρων (λευκά βέλη) φυσιολογικού βλεννογόνου. **B.** Ισχυρή πυρηνική έκφραση (βέλη) PELP1/MNAR σε επιθηλιακά κύτταρα αδενώματος. **C.** Έντονη ανοσοχρώση (βέλη) PELP1/MNAR στον πυρηνίσκο επιθηλιακών κυττάρων αδενώματος. **D.** Ισχυρή πυρηνική έκφραση PELP1/MNAR σε επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος (βέλη). Λεμφοκύτταρα (μικρά βέλη) και στρωματικοί μυοινοβλάστες (λευκά βέλη) εμφανίζουν μέτρια/ισχυρή ανοσοχρώση. **E.** Έντονη ανοσοχρώση (βέλη) PELP1/MNAR στον πυρηνίσκο επιθηλιακών κυττάρων αδενοκαρκινώματος

Η υπερέκφραση του PELP1/MNAR στα αδеноκαρκινώματα συσχετίζεται με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση

Για λόγους στατιστικής ανάλυσης, οι τιμές έκφρασης PELP1/MNAR μεγαλύτερες ή ίσες με τη διάμεση (170) στα αδеноκαρκινώματα θεωρήθηκαν ως υπερέκφραση. Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR στα αδеноκαρκινώματα και σε κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου, πιθανότητα υποτροπής ή χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου. Ωστόσο, ασθενείς με αδеноκαρκινώματα που υπερέκφραζαν PELP1/MNAR παρουσίασαν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση (log rank test: $p < 0.03$, εικόνα 43A) και μικρότερη πιθανότητα θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς με αδеноκαρκινώματα χωρίς υπερέκφραση PELP1/MNAR (εικόνα 44B) (44.7% έναντι 23.3%, $p = 0.02$). Το εύρημα επιβεβαιώθηκε με βάση το Cox proportional-hazards model τόσο σε μονοπαραγοντική ($p < 0.05$, 95% CI: 1.01-3.94), όσο και σε πολυπαραγοντική ανάλυση, κατά την οποία η υπερέκφραση PELP1/MNAR αναλύθηκε σε σχέση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου καθώς και την έκφραση ER β ($p = 0.03$, 95% CI: 1.095-5.092). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, εκτός από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR, το στάδιο της νόσου ($p < 0.01$) και ο βαθμός διαφοροποίησης ($p < 0.01$) αξιολογήθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες (πίνακας 18).

Εικόνα 43 Α. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR σε αδеноκαρκινώματα και συνολική επιβίωση. **Β.** Υπερέκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR σε ERβ θετικά αδеноκαρκινώματα και συνολική επιβίωση

Καί

Εικόνα 44 **A.** (X400) Έκφραση πρωτεΐνης ERβ σε σπάνια επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος, το οποίο δεν εμφάνισε υποτροπή. Λεμφοκύτταρα στην περιοχή του όγκου εμφανίζουν έντονη ανοσοχρώση και χρησιμεύουν ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας (internal positive control) **B.** Έκφραση πρωτεΐνης PELP1/MNAR σε σπάνια επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος, σχετιζόμενο με χαμηλή επιβίωση (7μήνες). Λεμφοκύτταρα στην περιοχή του όγκου εμφανίζουν έντονη ανοσοχρώση

Πίνακας 18. Πολυπαραγοντική ανάλυση με βάση το Cox hazard regression μοντέλο. Προγνωστική σημασία κλινικοπαθολογικών παραμέτρων, έκφρασης πρωτεΐνης ERβ και υπερέκφρασης πρωτεΐνης PELP1/MNAR στα επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος

Παράμετρος	<i>P</i> value	Exp(B)	95%CI
Φύλο	0.051* ¹	2.6	0.994 – 6.847
Στάδιο	<0.001	0.02	0.005 – 0.082
Ηλικία	0.9	0.99	0.958 – 1.039
Βαθμός διαφοροποίησης	0.007	0.064	0.009 – 0.465
Πρωτοπαθής εστία	0.9	0.978	0.357 – 2.68
Ιστολογικός τύπος	0.037* ²	0.22	0.054 – 0.912
ERβ έκφραση	0.25	1.004	0.997 – 1.01
PELP1/MNAR υπερέκφραση	0.035	2.388	1.095 – 5.092

*¹ Το φύλο δε βρέθηκε να έχει προγνωστική σημασία στη μονοπαραγοντική Cox ανάλυση και στην ανάλυση Kaplan-Meier

*² Ο ιστολογικός τύπος δε βρέθηκε να έχει προγνωστική σημασία στη μονοπαραγοντική Cox ανάλυση και στην ανάλυση Kaplan-Meier

Η υπερέκφραση του PELP1/MNAR στα ERβ θετικά αδενοκαρκινώματα συσχετίζεται με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση

Με δεδομένο το ότι ο PELP1/MNAR συνιστά συνενεργοποιητή του ERβ και ότι η έκφραση των δύο πρωτεϊνών συσχετίζεται στα αδενοκαρκινώματα, διερευνήθηκαν ανάλογες συσχετίσεις ανάμεσα στην υπερέκφραση του PELP1/MNAR και κλινικοπαθολογικές παραμέτρους σε επιμέρους υποπληθυσμούς ERβ θετικών και αρνητικών αδενοκαρκινωμάτων. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR δε βρέθηκε να συσχετίζεται με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως το χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου ή την πιθανότητα υποτροπής στα ERβ-αρνητικά αδενοκαρκινώματα. Επίσης, δε βρέθηκε να συσχετίζεται με την πιθανότητα θανάτου ή τη συνολική επιβίωση στα ERβ αρνητικά αδενοκαρκινώματα.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR δε συσχετίστηκε με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως το χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου ή την πιθανότητα υποτροπής στα ERβ θετικά αδενοκαρκινώματα (πίνακας 19). Ωστόσο, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR συσχετίστηκε με αυξημένη συνολική επιβίωση (log rank test: $p < 0.01$, εικόνα 43B) και μικρότερη πιθανότητα θανάτου (53.3% έναντι 24.6%, $p < 0.01$) σε ERβ-θετικά αδενοκαρκινώματα. Το εύρημα επιβεβαιώθηκε σε πολυπαραγοντική ανάλυση με βάση το Cox proportional-hazards model ($p < 0.04$, 95% CI: 1.05– 4.92).

Πίνακας 19. α. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης PELP1/MNAR σε ERβ θετικά αδενοκαρκινώματα και κλινικοπαθολογικές παράμετροι

<i>n</i> = 101		PELP1/MNAR (-)* <i>n</i> = 31 (+)* <i>n</i> = 70		<i>P</i> value
Στάδιο κατά Duke's				0.45
B	39	10	29	
C	56	18	38	
D	6	3	3	
Βαθμός διαφοροποίησης				0.35
I	20	5	15	
II	71	21	50	
III	10	5	5	
Φύλο				0.63
άνδρες	65	21	44	
γυναίκες	36	10	26	
Ιστολογικός τύπος				0.12
μη βλεννώδη	89	25	64	
βλεννώδη	12	6	6	
Θέση όγκου				0.2
δεξιό κόλον	28	11	17	
αριστερό κόλον	39	8	31	
ορθό	34	12	22	
Ηλικία διάμεση (εύρος)		66 (30-83)	66 (44-90)	0.66

* (+): υπερέκφραση, (-): όχι υπερέκφραση

β. TNM στάδιο και έκφραση πρωτεΐνης PELP1/MNAR στα ERβ θετικά αδενοκαρκινώματα

<i>n</i> = 101	PELP1/MNAR (-) <i>n</i> = 31 (+) <i>n</i> = 70		<i>P</i> value
T στάδιο			0.8
T1	0	0	
T2	5	8	
T3	23	56	
T4	3	6	
N στάδιο			0.1
N0	10	29	
N1	8	28	
N2	13	13	
M στάδιο			0.29
M0	28	67	
M1	3	3	

Ο AIB1 ανιχνεύεται στον πυρήνα επιθηλιακών αλλά και στρωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου

Η έκφραση της πρωτεΐνης AIB1 εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε 108 αδеноκαρκινώματα, 30 αδενώματα και 83 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Η πρωτεΐνη AIB1 ανιχνεύτηκε επαναλαμβανόμενα στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε στον πυρήνα ενδοθηλιακών, φλεγμονωδών, λείων μυικών κυττάρων και μυοϊνοβλαστών. Η παρούσα μελέτη εστίασε στη διερεύνηση της έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα.

Από τα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, 51\83 (61.5%) εξέφραζαν την πρωτεΐνη AIB1, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στα αδενώματα και αδеноκαρκινώματα ήταν 30/30 (100%) και 104\108 (96.3%). Οι διάμεσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της έκφρασης AIB1 σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδеноκαρκινώματα φαίνονται στον πίνακα 20. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την έκφραση της πρωτεΐνης AIB1 παρατίθενται στην εικόνα 45.

Πίνακας 20. Διάμεσες τιμές έκφρασης και τυπικές αποκλίσεις (TA) πρωτεΐνης AIB1

	AIB1Διάμεση (TA)
Φυσιολογικός βλεννογόνος	40 (30)
Αδενώματα	96 (57.9)
Αδеноκαρκινώματα	170 (69.3)

Εικόνα 45 Α. Μέτρια έκφραση πρωτεΐνης AIB1 σε επιθηλιακά κύτταρα φυσιολογικού βλεννογόνου. Στρωματικά κύτταρα, κυρίως λεμφοκύτταρα, εμφανίζουν επίσης θετική χρώση. (X400) Β. Μέτρια/ισχυρή έκφραση πρωτεΐνης AIB1 σε επιθηλιακά κύτταρα αδενώματος. (X400) C. Ισχυρή έκφραση πρωτεΐνης AIB1 σε επιθηλιακά κύτταρα αδenoκαρκινώματος. Κύτταρο σε μίτωση που δεν εμφανίζει ανοσοχρώση για πρωτεΐνη AIB1 φαίνεται στη μέση του κάτω μέρους της φωτογραφίας (X200)

Η έκφραση του AIB1 αυξάνει κατά την καρκινογένεση και συσχετίζεται με τοπική ανάπτυξη του όγκου, αλλά και με τη συνολική επιβίωση

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης AIB1 ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε φυσιολογικό βλεννογόνο σε σχέση με αδενώματα ($p<0.0001$) και αδenoκαρκινώματα ($p<0.0001$). Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης AIB1 ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε αδενώματα σε σχέση με αδenoκαρκινώματα ($p<0.0001$).

Για λόγους στατιστικής ανάλυσης, τιμές έκφρασης AIB1 μεγαλύτερες ή ίσες με τη διάμεση (170) στα αδenoκαρκινώματα θεωρήθηκαν ως υπερέκφραση. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 συσχετίστηκε με τοπικά προχωρημένη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης. Συγκεκριμένα, υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 βρέθηκε πιο συχνά σε αδenoκαρκινώματα με μεγαλύτερο T στάδιο (60% σε T3/T4 στάδιο έναντι 23% σε T1/T2 στάδιο, $p=0.012$). Αντίθετα, υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 βρέθηκε σε 53.3% των αδenoκαρκινωμάτων με διηθημένους λεμφαδένες, σε σχέση με 59.5% των αδenoκαρκινωμάτων χωρίς διηθημένους λεμφαδένες. Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν ήταν

στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 δε συσχετίστηκε με την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων τη στιγμή της διάγνωσης.

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης AIB1 στα αδενοκαρκινώματα και στις υπόλοιπες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου (πίνακας 21), στην πιθανότητα υποτροπής της νόσου ή στο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή. Ωστόσο, ασθενείς με αδενοκαρκινώματα που υπερεξέφραζαν AIB1 παρουσίασαν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση (log rank test: $p=0.007$, εικόνα 46) και μικρότερη πιθανότητα θανάτου σε σχέση με ασθενείς με αδενοκαρκινώματα χωρίς υπερέκφραση AIB1 (43.5% έναντι 19.3%, $p=0.008$). Το εύρημα επιβεβαιώθηκε στη μονοπαραγοντική ($p=0.01$, 95% CI: 1.28–5.87) αλλά και στην πολυπαραγοντική ανάλυση με βάση το Cox model πάντα σε σχέση με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου ($p=0.049$, 95% CI: 1.003–4.83). Επίσης, το στάδιο ($p=0.001$, 95% CI 1.65–7.31) και ο βαθμός διαφοροποίησης ($p=0.022$, 95% CI 1.13–4.86) αξιολογήθηκαν πάλι ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες.

Τόσο σε φυσιολογικό βλεννογόνο, όσο σε αδενώματα και αδενοκαρκινώματα, δεν παρουσιάστηκε σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης AIB1 και εκείνα της πρωτεΐνης ERβ.

Πίνακας 21. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 σε αδενοκαρκινώματα και κλινικοπαθολογικές παράμετροι (+: υπερέκφραση, -: όχι υπερέκφραση)

$n=108$		AIB1		P value
		(-) $n=47$	(+) $n=61$	
Στάδιο κατά Duke's				
B	42	17	25	0.23
C	61	26	35	
D	5	4	1	
Βαθμός διαφοροποίησης				
I	20	6	14	0.26
II	78	35	43	
III	10	6	4	
Φύλο				
άνδρες	69	34	35	0.1
γυναίκες	39	13	26	
Ιστολογικός τύπος				
μη βλεννώδη	98	41	57	0.27
βλεννώδη	10	6	4	
Θέση όγκου				
δεξιό κόλον	28	14	14	0.67
αριστερό κόλον	44	19	25	
ορθό	36	14	22	
Ηλικία διάμεση (εύρος)		67 (30-90)	65 (44-83)	0.33

Εικόνα 46. Υπερέκφραση πρωτεΐνης AIB1 σε αδενοκαρκινώματα και συνολική επιβίωση

Ο TIF2 ανιχνεύεται στον πυρήνα επιθηλιακών αλλά και στρωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου

Η έκφραση της πρωτεΐνης TIF2 εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε 110 αδενοκαρκινώματα, 30 αδενώματα και 83 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Η πρωτεΐνη TIF2 ανιχνεύτηκε επαναλαμβανόμενα στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε στον πυρήνα ενδοθηλιακών, φλεγμονωδών, λείων μυικών κυττάρων και μυοινοβλαστών. Η παρούσα μελέτη εστίασε στη διερεύνηση της έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα.

Όλα τα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, τα αδενώματα και αδενοκαρκινώματα εξέφραζαν την πρωτεΐνη TIF2. Οι διάμεσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της έκφρασης TIF2 σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδενοκαρκινώματα φαίνονται στον πίνακα 22. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την έκφραση της πρωτεΐνης TIF2 παρατίθενται στην εικόνα 47.

Πίνακας 22. Διάμεσες τιμές έκφρασης και τυπικές αποκλίσεις (TA) πρωτεΐνης TIF2

	TIF2 Διάμεση (TA)
Φυσιολογικός βλεννογόνος	150 (51.3)
Αδενώματα	200 (49.8)
Αδενοκαρκινώματα	240 (57.9)

Εικόνα 47 Α. Μέτρια έκφραση πρωτεΐνης TIF2 σε επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα φυσιολογικού βλεννογόνου (X400) Β. Ισχυρή έκφραση πρωτεΐνης TIF2 σε επιθηλιακά αδενώματος C. Ισχυρή έκφραση πρωτεΐνης TIF2 σε επιθηλιακά αδenoκαρκινώματος. Μιτωτικά κύτταρα φαίνονται αρνητικά για την πρωτεΐνη TIF 2

Πίνακας 23. Υπέρεκφραση της πρωτεΐνης TIF2 σε αδenoκαρκινώματα και κλινικοπαθολογικές παράμετροι

<i>n</i> = 110		TIF2		<i>P</i> value
		(-) <i>n</i> = 53	(+) <i>n</i> = 57	
Στάδιο κατά Duke's				0.8
B	42	20	22	
C	63	30	33	
D	5	3	2	
Βαθμός διαφοροποίησης				0.38
I	21	8	13	
II	78	38	40	
III	11	7	4	
Φύλο				0.6
άνδρες	69	32	37	
γυναίκες	41	21	20	
Ιστολογικός τύπος				0.45
μη βλεννώδη	98	46	52	
βλεννώδη	12	7	5	
Θέση όγκου				0.42
δεξιό κόλον	29	13	16	
αριστερό κόλον	45	25	20	
ορθό	36	15	21	
Ηλικία διάμεση (εύρος)		66 (45-90)	66 (30-83)	0.8

Η έκφραση του TIF2 αυξάνει κατά την καρκινογένεση και στα αδеноκαρκινώματα συσχετίζεται με την έκφραση του AIB1

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TIF2 ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε φυσιολογικό βλεννογόνο σε σχέση με αδενώματα ($p<0.0001$) και αδеноκαρκινώματα ($p<0.0001$). Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης TIF2 δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε αδενώματα και αδеноκαρκινώματα ($p=0.58$).

Για λόγους στατιστικής ανάλυσης, οι τιμές έκφρασης TIF2 μεγαλύτερες ή ίσες με τη διάμεση (240) στα αδеноκαρκινώματα θεωρήθηκαν ως υπερέκφραση. Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης TIF2 στα αδеноκαρκινώματα και στις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου (πίνακας 23), στην πιθανότητα υποτροπής της νόσου ή στο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή. Επίσης, υπερέκφραση της πρωτεΐνης TIF2 δε συσχετίστηκε με την πιθανότητα θανάτου ή τη συνολική επιβίωση.

Σε φυσιολογικό βλεννογόνο και σε αδενώματα, δεν παρουσιάστηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TIF2 και εκείνα των πρωτεϊνών AIB1 και ER β . Ωστόσο, σε αδеноκαρκινώματα, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TIF2 συσχετίστηκαν σημαντικά με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης AIB1 ($r=0.273$, $p=0.005$), αλλά όχι με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ER β .

Όταν τα ευρήματα αυτά συνδυάστηκαν με τα ανωτέρω σχετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης ER β και της πρωτεΐνης AIB1, βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα: από τα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου 47/83 (56.6%) εξέφραζαν και τις τρεις πρωτεΐνες, 4/83 (4.8%) εξέφραζαν AIB1 και TIF2, 31/83 (37.4%) εξέφραζαν ER β και TIF2 και 1/83 (1.2%) εξέφραζε μόνο TIF2. Από τα 108 αδеноκαρκινώματα, 96 (88.9%)

εξέφραζαν και τις τρεις πρωτεΐνες, οκτώ (7.4%) εξέφραζαν AIB1 και TIF2, δύο (1.85%) εξέφραζαν ER β and TIF2, ενώ δύο (1.85%) εξέφραζαν μόνο TIF2. Δύο αδenoκαρκινώματα που δεν αξιολογήθηκαν για την έκφραση του AIB1 συνέκφραζαν ER β και TIF2.

Με δεδομένο ότι οι πρωτεΐνες AIB1 και TIF2 συνιστούν συνενεργοποιητές του οιστρογονικού υποδοχέα, διερευνήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στην ταυτόχρονη συνέκφραση των τριών πρωτεϊνών και σε κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Όλα τα αδenoκαρκινώματα που εξέφραζαν ER β και ταυτόχρονα υπερέκφραζαν AIB1 και TIF2 παρουσίασαν τοπική επέκταση (T3/T4 στάδιο) συγκριτικά με το 83.3% αδenoκαρκινωμάτων χωρίς ανάλογη συν-(υπερ)έκφραση ($p=0.036$). Άλλες κλινικοπαθολογικές παράμετροι δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε αδenoκαρκινώματα με και χωρίς συν-(υπερ)έκφραση των πρωτεϊνών ER β , AIB1 και TIF2.

Διερεύνηση συσχετίσεων ανάμεσα στα επίπεδα ανοσοιστοχημικής έκφρασης των υπό μελέτη βιοδεικτών στα αδenoκαρκινώματα και ανάμεσα στη συνδυασμένη (υπερ)έκφραση βιοδεικτών και σε κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

Σημαντική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης κυτταροπλασματικού HER3 και εκείνα της πρωτεΐνης PELP1/MNAR ($r=0.25$, $p=0.008$), AIB1 ($r=0.3$, $p=0.002$) και TIF2 ($r=0.2$, $p=0.038$). Ωστόσο, δεν αναδείχθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του κυτταροπλασματικού HER3 και του οιστρογονικού υποδοχέα β . Επίσης, σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών AIB1 και PELP1/MNAR ($r=0.24$, $p=0.011$). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του ER β με εκείνα του PELP1/MNAR καθώς και ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των

πρωτεϊνών AIB1 και TIF2. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του πυρηνικού HER3 και των υπόλοιπων πρωτεϊνικών βιοδεικτών (πίνακας 24).

Με δεδομένο ότι οι υπό μελέτη συμπαράγοντες (coregulators) συνιστούν συστατικά κομβικών μονοπατιών, όπως του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και του οιστρογονικού υποδοχέα, διερευνήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στην ταυτόχρονη συνέκφραση των πρωτεϊνών και σε κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Ασθενείς με αδеноκαρκινώματα θετικά ως προς την έκφραση του κυτταροπλασματικού HER3 και ταυτόχρονη υπερέκφραση του AIB1 παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό θανάτων από εκείνους με αδеноκαρκινώματα χωρίς αυτά τα χαρακτηριστικά έκφρασης (19.3% έναντι 42.5%, $p=0.01$). Επίσης, η συνολική επιβίωση ασθενών με HER3 θετικά αδеноκαρκινώματα με ταυτόχρονη υπερέκφραση του AIB1 ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με ασθενείς με αδеноκαρκινώματα χωρίς αυτά τα χαρακτηριστικά έκφρασης ($p=0.01$, εικόνα 48).

Επιπλέον συνδυασμοί (υπερ)έκφρασης παραγόντων εξετάστηκαν, χωρίς να αναδειχθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κάποια από τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν ορισμένες ενδιαφέρουσες συσχετίσεις, οι οποίες δεν υπερκέρασαν τον ουδό της στατιστικής σημαντικότητας. Συγκεκριμένα, αδеноκαρκινώματα θετικά ως προς την έκφραση του ER β και του κυτταροπλασματικού HER3 παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπών από εκείνα χωρίς ταυτόχρονη έκφραση των δύο πρωτεϊνών (44.8% έναντι 28.1%, $p=0.1$). Επίσης, το χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου ήταν μικρότερο σε ER β /HER3 θετικά αδеноκαρκινώματα σε σχέση με μη ER β /HER3 θετικά αδеноκαρκινώματα ($p=0.068$, εικόνα 49). Επιπλέον,

ασθενείς με αδеноκαρκινώματα θετικά ως προς την έκφραση του κυτταροπλασματικού HER3 και ταυτόχρονη υπερέκφραση του PELP1/MNAR παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό θανάτων από εκείνους με αδеноκαρκινώματα χωρίς αυτά τα χαρακτηριστικά έκφρασης (24.2% έναντι 40.9%, $p=0.064$). Επίσης, η συνολική επιβίωση ασθενών με HER3 θετικά αδеноκαρκινώματα με ταυτόχρονη υπερέκφραση του PELP1/MNAR ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με ασθενείς με αδеноκαρκινώματα χωρίς αυτά τα χαρακτηριστικά έκφρασης ($p=0.095$, εικόνα 50).

Εικόνα 48. HER3 θετικά αδеноκαρκινώματα με ταυτόχρονη υπερέκφραση AIB1 εμφανίζουν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση ($p=0.01$)

Εικόνα 49. Αδενοκαρκινώματα με ταυτόχρονη έκφραση ERβ/HER3 εμφανίζουν τάση για μικρότερο χρονικό διάστημα ως υποτροπή της νόσου ($p=0.068$)

Πίνακας 24. Συσχετίσεις επιπέδων έκφρασης βιοδεικτών στα αδενοκαρκινώματα

		PELP1	TIF2	AIB1	ERβ	HERκυτ/σμα	HERπυρηνικό
PELP1	Correlation Coefficient (<i>r</i>)	1.000	.115	.244*	.187*	.249**	-.148
	Sig. (2-tailed) (<i>p</i>)	.	.231	<u>.011</u>	<u>.048</u>	<u>.008</u>	.119
TIF2	Correlation Coefficient (<i>r</i>)	.115	1.000	.273**	.157	.200*	-.007
	Sig. (2-tailed) (<i>p</i>)	.231	.	<u>.005</u>	.106	<u>.038</u>	.944
AIB1	Correlation Coefficient (<i>r</i>)	.244*	.273**	1.000	.054	.302**	.053
	Sig. (2-tailed) (<i>p</i>)	<u>.011</u>	<u>.005</u>	.	.586	<u>.002</u>	.592
ERβ	Correlation Coefficient (<i>r</i>)	.187*	.157	.054	1.000	.105	-.132
	Sig. (2-tailed) (<i>p</i>)	<u>.048</u>	.106	.586	.	.273	.168
HER3 κυτταροπλα- σματικό	Correlation Coefficient (<i>r</i>)	.249**	.200*	.302**	.105	1.000	.225*
	Sig. (2-tailed) (<i>p</i>)	<u>.008</u>	<u>.038</u>	<u>.002</u>	.273	.	<u>.008</u>
HERπυρηνικό	Correlation Coefficient (<i>r</i>)	-.148	-.007	.053	-.132	.225*	1.000
	Sig. (2-tailed) (<i>p</i>)	.119	.944	.592	.168	<u>.008</u>	.

Εικόνα 50. HER3 θετικά αδενοκαρκινώματα με ταυτόχρονη υπερέκφραση PELP1/MNAR εμφανίζουν τάση για μεγαλύτερη συνολική επιβίωση ($p=0.095$)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος της έκφρασης της πρωτεΐνης HER-3 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Αν και ο υποδοχέας HER-3 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο γενικά σε διαδικασίες που προάγουν την καρκινογένεση, η σημασία του στον καρκίνο του παχέος εντέρου παραμένει αδιευκρίνιστη. Στην παρούσα μελέτη, η κυτταροπλασματική και πυρηνική έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 διερευνήθηκε σε 119 αδеноκαρκινώματα, 110 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου και 24 αδενώματα με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Σε ό,τι αφορά στην κυτταροπλασματική χρώση, η πρωτεΐνη HER-3 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο 79.1 % των δειγμάτων φυσιολογικού βλεννογόνου, στο 95.8% των αδενωμάτων και στο 79% των αδеноκαρκινωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, στις οποίες η κυτταροπλασματική υπερέκφραση του HER-3 σε καρκινώματα κυμαινόταν από 68.75% ως 89% [87, 88, 150]. Στην παρούσα μελέτη πλήρης ομοιογενής μεμβρανική χρώση του υποδοχέα δεν ανιχνεύτηκε, ενώ σε προηγούμενη μελέτη [86] περιγράφηκε σε ποσοστό 36%. Τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής έκφρασης της πρωτεΐνης HER-3 βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα στο φυσιολογικό βλεννογόνο από τα αδενώματα και τα αδеноκαρκινώματα. Φαίνεται δηλαδή, ότι η πρωτεΐνη HER-3 συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο.

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 στα αδеноκαρκινώματα και τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Σε προηγούμενη μελέτη είχε συσχετιστεί με την ηλικία των ασθενών και το βαθμό διαφοροποίησης, αλλά με καμία από τις υπόλοιπες παραμέτρους [151]. Διαφορές στα αποτελέσματα των μελετών μπορεί να

οφείλονται στην ετερογένεια των υπό εξέταση πληθυσμών και σε διαφοροποιήσεις σε λεπτομέρειες μεθοδολογίας και ανάλυσης δεδομένων.

Η πρωτεΐνη HER-3 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων στο 81.8% των δειγμάτων φυσιολογικού βλεννογόνου, στο 54.2% των αδενωμάτων και στο 22.7% των αδenoκαρκινωμάτων. Τα επίπεδα της πυρηνικής έκφρασης της πρωτεΐνης HER-3 βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στο φυσιολογικό βλεννογόνο από τα αδενώματα και τα αδenoκαρκινώματα. Επιπλέον, βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στα αδενώματα από τα αδenoκαρκινώματα. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ελάττωση της πυρηνικής έκφρασης της πρωτεΐνης HER-3 κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης HER-3 στο παχύ έντερο δεν έχει περιγραφεί σε άλλες μελέτες, ωστόσο έχει περιγραφεί σε επιθηλιακά κύτταρα προστατικού ιστού, και έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη αδenoκαρκινώματος του προστάτη [152]. Ενδεχομένως, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν, πληθώρα βιολογικών ρόλων που ο HER-3 έχει σε διαφορετικούς ιστούς, τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όσο και κατά την καρκινογένεση. Επίσης, η δυναμική ισορροπία της κατάστασης φωσφορυλίωσης του HER-3 επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων σε συγκεκριμένα χωρο/χρονικά πλαίσια. Συνολικά, τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα σε ο,τι αφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 υποδηλώνουν μια πιθανή μεταβολή της τοπογραφίας του υποδοχέα από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο.

Σε προηγούμενη μελέτη, αυξημένα επίπεδα πυρηνικής πρωτεΐνης HER-3 συσχετίστηκαν με υψηλό βαθμό κακοήθειας (high Gleason score) σε αδenoκαρκινώματα του προστάτη [152]. Στην παρούσα μελέτη, η στατιστική ανάλυση

δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης HER-3 στα αδενοκαρκινώματα και τις υπό εξέταση κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Ούτε τα επίπεδα κυτταροπλασματικής ούτε εκείνα της πυρηνικής έκφρασης του HER-3 στα αδενοκαρκινώματα συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα [86, 151], ωστόσο σε προηγούμενη μελέτη η έκφραση του υποδοχέα σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου συσχετίστηκε με χαμηλή επιβίωση [88].

Περιορισμένος αριθμός δεδομένων είναι διαθέσιμος σχετικά με την πυρηνική εντόπιση των υποδοχέων της οικογένειας HER και ειδικότερα του HER-3 [153-156]. Πυρηνική εντόπιση του HER-3 έχει περιγραφεί σε επιθηλιακά κύτταρα τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε κακοήγη ιστό μαστικού αδένα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο HER-3 έχει τη δυνατότητα μετακίνησης μεταξύ πυρήνα, κυτταροπλάσματος και κυτταρικής μεμβράνης, ανάλογα με την παρουσία εξωγενών παραγόντων, όπως η heregulin, που θεωρείται προσδέτης του υποδοχέα. Επιπλέον, ο HER-3 έχει ανιχνευτεί και στον πυρηνίσκο των κυττάρων, αναδεικνύοντας πιθανή συμμετοχή του υποδοχέα στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των ριβοσωμάτων και στην κυτταρική διαφοροποίηση. Μελέτη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη και προστατικό ιστό υποστήριξε ότι ο πυρηνικός μη-φωσφορυλιωμένος HER-3 έχει ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας του ανδρογονικού υποδοχέα και σχετίζεται με την πρόοδο των αδενοκαρκινωμάτων (tumor progression) [152]. Η πυρηνική εντόπιση του HER-3, η οποία παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, ενδεχομένως υποδηλώνει πιθανό σημαντικό ρόλο του υποδοχέα στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας, παρομοίως με άλλα μέλη της οικογένειας HER [153].

Ο ρόλος της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης HER-3 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η φωσφορυλιωμένη μορφή του HER-3 (pHER-3) ανιχνεύτηκε στη μεμβράνη και στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου του παχέος εντέρου, καθώς και στο λείο μυϊκό ιστό. Η μεμβρανική χρώση ήταν ανομοιογενής και μη επαναλαμβανόμενη και δεν συμπεριλήφθηκε στη στατιστική ανάλυση. Τα επίπεδα πυρηνικής έκφρασης δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στο φυσιολογικό βλεννογόνο, τα αδενώματα και τα αδενοκαρκινώματα. Παρατηρήθηκε τάση αύξησης των επιπέδων πυρηνικής έκφρασης του pHER-3 στα αδενώματα σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο, ωστόσο η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενδεχομένως λόγω του χαμηλού αριθμού αδενωμάτων. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλίωση του HER-3 είναι ενδεχομένως ένα σημαντικό παθογενετικό γεγονός κατά την ανάπτυξη των αδενωμάτων και μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών ίσως επιβεβαιώσουν μια τέτοια υπόθεση. Τόσο στο φυσιολογικό βλεννογόνο όσο στα αδενώματα και στα αδενοκαρκινώματα, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της φωσφορυλιωμένης και μη-φωσφορυλιωμένης μορφής του HER-3. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης HER-3 ενδεχομένως συμβαίνει ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης HER-3 στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα. Τα επίπεδα έκφρασης του pHER-3 ήταν σημαντικά μεγαλύτερα σε αδενοκαρκινώματα σταδίου D σε σχέση με σταδίου B. Ωστόσο, δε συσχετίστηκαν με τις υπόλοιπες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους ή με τη συνολική επιβίωση. Η παρούσα μελέτη φαίνεται να είναι η πρώτη που διερευνά το ρόλο της έκφρασης φωσφορυλιωμένης μορφής του HER-3 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Ο ρόλος της έκφρασης του γονιδίου HER-3 (επίπεδα mRNA) στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HER-3 (mRNA) μετρήθηκαν σε 54 αδενοκαρκινώματα και 29 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, και το γονίδιο βρέθηκε να εκφράζεται σε όλα τα δείγματα. Αν και υπήρχε μεγάλο εύρος τιμών στα επίπεδα HER-3 mRNA στα ιστικά δείγματα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο φυσιολογικό βλεννογόνο και στα αδενοκαρκινώματα. Σε προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου [157], τα επίπεδα HER-3 mRNA μετρήθηκαν με τη μέθοδο Northern blot analysis και ανιχνεύτηκαν στο 55% των πρωτοπαθών ή μεταστατικών εστιών, αλλά μόνο στο 22% των δειγμάτων φυσιολογικού βλεννογόνου και στο 32% των δειγμάτων φυσιολογικού ηπατικού ιστού. Ωστόσο, η μέθοδος Northern blot analysis είναι λιγότερο ευαίσθητη από τη μέθοδο RT-PCR, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η διάμεση ηλικία των ασθενών με αδενοκαρκινώματα που είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης HER-3 mRNA ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα. Ακόμη, χαμηλότερα επίπεδα HER-3 mRNA συσχετίστηκαν με εντόπιση του όγκου στο δεξιό κόλον. Το συγκεκριμένο εύρημα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, λαμβάνοντας υπ'όψη τα διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά των αδενοκαρκινωμάτων στο δεξιό και αριστερό κόλον, και ενδεχομένως τα επίπεδα έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα, ο οποίος διαντιδρά (cross talk) με σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την οικογένεια HER. Επίσης, τα επίπεδα HER-3 mRNA στα αδενοκαρκινώματα συσχετίστηκαν με την πιθανότητα διήθησης λεμφαδένων. Δεδομένου ότι η διήθηση λεμφαδένων έχει μεγάλη προγνωστική

σημασία στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, τα επίπεδα HER-3 mRNA ενδεχομένως να χρησιμεύσουν ως σημαντικός βιοδείκτης σε ό,τι αφορά στην πρόγνωση της νόσου. Παρά το ότι δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα HER-3 mRNA και τη συνολική επιβίωση, αυξημένα επίπεδα HER-3 mRNA συσχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου και μειωμένο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία αναδεικνύει προγνωστική σημασία των επιπέδων έκφρασης του HER-3 γονιδίου σε ό,τι αφορά στην ελεύθερη-νόσου επιβίωση στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών από μεγαλύτερες μελέτες ενδεχομένως να αναδείξει τον υποδοχέα HER-3 σε ιδιαίτερα σημαντικό προγνωστικό βιοδείκτη στον καρκίνο παχέος εντέρου.

Καινούριες βιολογικές θεραπείες στόχευσης του EGFR με μονοκλωνικά αντισώματα έχουν εγκριθεί τα τελευταία χρόνια για την αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου [74]. Ο βαθμός κλινικής ανταπόκρισης σε αυτές τις θεραπείες ενδεχομένως εξαρτάται από βιολογικές διαντιδράσεις του EGFR με άλλα μέλη της οικογένειας HER, όπως με τον HER-3. Ο σχηματισμός ετεροδιμερών EGFR/HER-3 ενέχεται στη ρύθμιση ενδοκυττάριας σηματοδότησης και έμμεσα στη μεταγραφική δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, η περαιτέρω διερεύνηση της προβλεπτικής σημασίας των επιπέδων έκφρασης του HER-3 στην ανταπόκριση σε αντι-EGFR θεραπείες αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Επικύρωση τέτοιας υπόθεσης στο μέλλον, ίσως να συντελέσει στην επιλογή κατάλληλων υποπληθυσμών ασθενών, οι οποίοι έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να ωφεληθούν από συγκεκριμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Με αυτό τον τρόπο, η θεραπεία στον καρκίνο του παχέος εντέρου μπορεί να εξελιχθεί από «εμπειρική» σε περισσότερο «ορθολογική» και εξατομικευμένη.

Ο ρόλος της έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η έκφραση των πρωτεϊνών ER α , ER β εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε 113 αδενοκαρκινώματα, 30 αδενώματα και 88 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Η έκφραση του ER α ήταν σπάνια στον ιστό του παχέος εντέρου των ασθενών της μελέτης, και η έκφρασή του δε φάνηκε να έχει ιδιαίτερο ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Προηγούμενη μελέτη απέτυχε, επίσης, να αναδείξει σημαντικά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης ER α στο παχύ έντερο, μολονότι ER α mRNA ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο Northern blot [104]. Στη μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης ER α mRNA ανάμεσα σε φυσιολογικό βλεννογόνο και αδενοκαρκίνωμα, ενώ τα επίπεδα έκφρασης ER α mRNA στα αδενοκαρκινώματα δε συσχετίστηκαν με το φύλο, το στάδιο και το βαθμό διαφοροποίησης. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν την παρουσία ισχυρής έκφρασης πρωτεΐνης ER α σε κρύπτες παχέος εντέρου [158]. Διαφορές στο αντίσωμα και στις χρησιμοποιούμενες αραιώσεις ενδεχομένως να παίζουν ρόλο στις διαφορές των αποτελεσμάτων στις μελέτες. Ωστόσο, στην τελευταία μελέτη δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ER α ανάμεσα σε φυσιολογικό βλεννογόνο και σε μη-δυσπλαστικές εστίες υπερπλαστικών κρυπτών (aberrant crypt foci), οι οποίες αποτελούν πρώιμο παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό αδενωμάτων στο παχύ έντερο.

Σε ο,τι αφορά στην ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη ER β , παρατηρήθηκε θετικότητα στο 89.8% των δειγμάτων φυσιολογικού βλεννογόνου, σε όλα τα αδενώματα και στο 89.4% των αδενοκαρκινωμάτων. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε

συμφωνία με αντίστοιχα προηγούμενων μελετών [103, 148]. Η πρωτεΐνη ER β ανιχνεύτηκε κυρίως στον πυρήνα, ενώ πλήρης ξεκάθαρη κυτταροπλασματική χρώση δεν παρατηρήθηκε. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με προηγούμενα δεδομένα, [147, 149], ενώ κυτταροπλασματική χρώση έχει αναφερθεί σε αδenoκαρκινώματα σε σχέση με δείγματα φυσιολογικού ιστού [148], υποδηλώνοντας πιθανή αλλαγή τοπογραφίας του υποδοχέα κατά της διάρκεια της καρκινογένεσης.

Σημαντική αύξηση των επιπέδων ER β από το φυσιολογικό βλεννογόνο στο αδenoκαρκίνωμα διαπιστώθηκε, αναδεικνύοντας πιθανό ρόλο του υποδοχέα στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Το εύρημα είναι ασύμφωνο με δεδομένα από κάποιες προηγούμενες μελέτες. Έχει αναφερθεί ότι ο υποτιθέμενος προστατευτικός ρόλος των οιστρογόνων στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου ασκείται μέσω του ER β [103, 147, 159, 160], ο οποίος περιγράφεται συχνά ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο [161]. Δεδομένα υποστηρίζουν ότι απώλεια του ER β οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό, απώλεια διαφοροποίησης, και μειωμένη απόπτωση σε επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου, αναδεικνύοντας το ρόλο του ER β στην οργάνωση και συντήρηση της μικροαρχιτεκτονικής του επιθηλιακού φραγμού [162]. Ωστόσο, ο ακριβής *in vivo* μηχανισμός της επίδρασης των οιστρογόνων στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Λειτουργικός ρόλος του ER β στη διαμεσολάβηση *in vitro* ορμονικών επιδράσεων στην κυτταρική αύξηση έχει περιγραφεί [102]. Σε προηγούμενη μελέτη, τα επίπεδα ER β mRNA ήταν υψηλότερα σε αδenoκαρκίνωμα σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο στην πλειονότητα των δειγμάτων [147]. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν δημοσιευτεί [107], προτείνοντας το πιθανό ογκογόνο δυναμικό του ER β . Στη μελέτη αυτή, και οι δύο κύριες ισομορφές του

υποδοχέα, $\beta 1$ και $\beta 2$, βρέθηκαν αυξημένες στον καρκινικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο και η ισομορφή $\beta 2$ χαρακτηρίστηκε από εντονότερη αύξηση. Επιπλέον, αύξηση στα επίπεδα της ισομορφής $ER\beta 1$ φαίνεται να προδιαθέτει σε μικροδορυφορική αστάθεια, ένα σύνθηδες φαινόμενο στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο [149]. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σε ο,τι αφορά στην ισομορφή $ER\beta 1$ προτείνουν ένα πιθανό ρόλο αυτής της ισομορφής στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο. Αξιοσημείωτα, η έκφραση του $ER\beta 1$ βρέθηκε να αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα υποτροπής της νόσου σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [163]. Επίσης, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού υπό θεραπεία με το αντι-οιστρογόνο ταμοξιφαίνη, ο $ER\beta$ βρέθηκε να διαμεσολαβεί στη μεταγραφή ογκογονιδίων μέσω του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, οδηγώντας σε πρόοδο της νόσου [164].

Δεδομένα που παρουσιάζουν σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ενδογενούς οιστραδιόλης και της επίπτωσης ορθοκολικού καρκίνου δημοσιεύτηκαν πρόσφατα. Το εύρημα παρέμεινε σημαντικό ακόμη και μετά από στατιστικό έλεγχο των γνωστών παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου [165]. Πληθώρα *in vitro* μελετών έχει αναδείξει μιτογόνο και πιθανώς ογκογόνο δράση των οιστρογόνων σε επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου [166-169]. Σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, η οιστραδιόλη φαίνεται να ενεργοποιεί το μονοπάτι mitogen-activated protein kinase (MAPK), οδηγώντας σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα και σύνθεση πρωτεϊνών που επάγουν κυτταρική αύξηση και έντονο πολλαπλασιασμό [170, 171]. Υπάρχουν, επίσης, δεδομένα που δείχνουν μειωμένη μεταβολική απενεργοποίηση της οιστραδιόλης στον καρκινικό ιστό συγκριτικά με το φυσιολογικό βλεννογόνο, προτείνοντας ότι τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου ίσως εκτίθενται σε

υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης συγκριτικά με μη καρκινικά κύτταρα [172, 173]. Ο προστατευτικός ρόλος της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης μπορεί να εξηγηθεί από τη διαφορετική ενεργότητα της οιστρόνης, η οποία συχνά περιέχεται σε ορμονικά σκευάσματα, σε σχέση με την ενδογενή οιστραδιόλη στα κύτταρα του παχέος εντέρου [174]. Με δεδομένο ότι ο ER β αποτελεί την κυρίαρχο οιστρογονικό υποδοχέα στον ιστό του παχέος εντέρου, τα ευρήματα αυτά ίσως υποδηλώνουν ένα πιθανό ορμονοειδικό (ligand-dependent) ρόλο του οιστρογονικού υποδοχέα στη σηματοδότηση κυτταρικής αύξησης στο παχύ έντερο.

Η αυξητική τάση των επιπέδων του ER β κατά την κακοήθη εξαλλαγή του βλεννογόνου ήταν στατιστικά σημαντική μόνο σε άνδρες. Το εύρημα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, με δεδομένο τη διαφορά επίπτωσης και εντόπισης της νόσου στα δύο φύλα [175]. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ότι η ελάττωση της έκφρασης ER β στα αδενοκαρκινώματα διέφερε στα δύο φύλα [147, 159]. Η οιστρογονοεξαρτώμενη σηματοδότηση ενδεχομένως να διαφέρει στα δύο φύλα, αντανakλώντας διακριτά επίπεδα ενδογενών ορμονών καθώς και την παρουσία ειδικών συμπαραγόντων στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον. Επίσης, το προ-εμμηνορυσιακό ορμονικό προφίλ ή/και θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης ίσως να τροποποιεί το πρότυπο έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα στο παχύ έντερο των γυναικών επηρεάζοντας την οιστρογονοεξαρτώμενη σηματοδότηση πριν την έναρξη της διαδικασίας της κακοήθους εξαλλαγής. Στην παρούσα μελέτη, μόνο μια ασθενής βρισκόταν σε προ-εμμηνορυσιακή ηλικία (47 ετών), ενώ πληροφορίες σε σχέση με θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης πριν τη διάγνωση της νόσου δεν ήταν διαθέσιμες. Ακόμη, ο αριθμός των θήλεων ασθενών στη

μελέτη ήταν μικρότερος από εκείνον των αρρένων, (42 έναντι 71), με συνέπεια ίσως να μην παρέχει αντίστοιχη αρκετή στατιστική δύναμη (underpowered).

Σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του ER β και σε κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου δεν ανεδείχθησαν ούτε στην παρούσα, ούτε σε προηγούμενες μελέτες [107, 148]. Αντίθετα, συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του ER β , το στάδιο και την εντόπιση της νόσου έχει παρουσιαστεί από τον Jassam *et al* [147]. Σε άλλη μελέτη, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ισομορφής ER β 2 συσχετίστηκαν με εντόπιση της νόσου στο δεξιό κόλον και με παρουσία λεμφαδενικής διήθησης, ενώ χαμηλότερα επίπεδα ER β 1 συσχετίστηκαν με πιο αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα και τοπικά επιθετική νόσο [149]. Η ασυμφωνία δεδομένων στις ερευνητικές μελέτες μερικώς ερμηνεύεται από την παρουσία διακριτών ισομορφών του ER β , οι οποίες ενδεχομένως ασκούν αντίθετες δράσεις στη μεταγραφή γονιδίων στόχων οδηγώντας σε διαφορετικά κλινικά αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της πρωτεΐνης ER β 1 συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου και μειωμένο χρονικό διάστημα έως την υποτροπή. Προς το παρόν, μια ακόμη μελέτη έχει διερευνήσει την προγνωστική σημασία του ER β στον καρκίνο του παχέος εντέρου και δε διαπίστωσε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του ER β και τη συνολική επιβίωση [148]. Επομένως, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που ανιχνεύει συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του ER β 1 και στην ελεύθερη-νόσου επιβίωση. Δεδομένα από περισσότερες μελέτες απαιτούνται για την επιβεβαίωση του πιθανού προγνωστικού ρόλου του ER β . Αξιοσημείωτα, η έκφραση του ER β 1 έχει αναδειχθεί σε παράγοντα προβλεπτικό της υποτροπής της νόσου σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα του μαστού που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ταμοξιφαίνη [163]. Επιπλέον, διακυμάνσεις στα επίπεδα

του υποδοχέα ή/και στην υποπυρηνική τοπογραφία του ίσως επηρεάζει την επίδραση του υποδοχέα στο γονιδίωμα και το ρόλο του στη μεταγραφική δραστηριότητα στα κύτταρα του παχέος εντέρου. Επίσης, διακυμάνσεις σε βιολογικά δείγματα από διαφορετικούς πληθυσμούς, τεχνικές και μεθοδολογικές διαφορές ίσως ευθύνονται για διαφορές ανάμεσα στα αποτελέσματα μελετών. Ακόμη, η επιλογή ενός συγκεκριμένου ουδού (cut-off) ανοσοϊστοχημικής έκφρασης συχνά μπορεί να προκαλέσει σφάλμα μετρήσεων. Στην παρούσα μελέτη, η επιλογή του ουδού βασίστηκε σε δεδομένα από μεγάλο αριθμό προηγούμενων μελετών.

Ο ρόλος της έκφρασης του συμπαράγοντα PELP1/MNAR στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο PELP1/MNAR αποτελεί σημαντικό συμπαράγοντα (coregulator) του οιστρογονικού υποδοχέα, παίζοντας ρόλο τόσο στις γονιδιωματικές όσο και στις μη γονιδιωματικές δράσεις αυτού. Στην παρούσα μελέτη, η διερεύνηση της έκφρασής του πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε 113 αδеноκαρκινώματα, 19 αδενώματα και 88 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Βρέθηκε να εκφράζεται στο 94.3% των δειγμάτων φυσιολογικού βλεννογόνου, σε όλα τα αδενώματα και στο 93.8% των αδеноκαρκινωμάτων. Θετική ανοσοχρώση για τον παράγοντα ανιχνεύτηκε στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων, αντιστοιχώντας στην τοπογραφία που περιγράφεται σε προηγούμενες μελέτες. Κυτταροπλασματική ανοσοχρώση έχει αναφερθεί σε περίπου 50% των αδеноκαρκινωμάτων του μαστού, καθώς και σε αδеноκαρκινώματα ενδομητρίου [123, 133]. Η πυρηνική εντόπιση φαίνεται να αντανakλά τη σημασία του παράγοντα στις επιδράσεις του οιστρογονικού υποδοχέα στο γονιδίωμα, καθορίζοντας τη σύσταση του μεταγραφικού συμπλόκου, και με τον τρόπο αυτό τα γονίδια στόχους.

Αξιοσημείωτα, η ανοσοχρώση για τον PELP1/MNAR βρέθηκε να είναι περισσότερο έντονη στον πυρηνίσκο των κυττάρων σε σημαντικό αριθμό αδενωμάτων και αδеноκαρκινωμάτων. Η βιολογική σημασία του συγκεκριμένου ευρήματος παραμένει ασαφής. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PELP1/MNAR βρέθηκαν να αυξάνονται σημαντικά κατά τη μετάπτωση του ιστού από φυσιολογικό βλεννογόνο, σε αδενώματα και αδеноκαρκινώματα, υποδηλώνοντας πιθανή συμμετοχή του συμπαράγοντα στην ογκογόνο σηματοδότηση και μεταγραφική δραστηριότητα. Αντίστοιχα ευρήματα έχουν περιγραφεί στο αδеноκαρκίνωμα του μαστού [123, 124, 176, 177], του ενδομητρίου [133], των ωοθηκών [124] και των σιελογόνων αδένων [178].

Σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του συμπαράγοντα PELP1/MNAR και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων της νόσου δεν παρατηρήθηκαν στη μελέτη. Ωστόσο, υπερέκφραση του PELP1/MNAR στα αδеноκαρκινώματα συσχετίστηκε με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση και μειωμένη πιθανότητα θανάτου κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε σε πολυπαραγοντική ανάλυση, στην οποία το στάδιο και ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου συναξιολογήθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες. Η παρούσα μελέτη φαίνεται να είναι η πρώτη, η οποία διερευνά και αναδεικνύει τον πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης PELP1/MNAR στην παθογένεια και την πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Ο ρόλος της ταυτόχρονης έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα και του συμπαράγοντα PELP1/MNAR στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών ER β και PELP1/MNAR από το φυσιολογικό βλεννογόνο στον καρκινικό ιστό υποδηλώνει πιθανή συνδυαστική σημασία των πρωτεϊνών στη διαδικασία καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Αν και δεν υπάρχουν προηγούμενα δεδομένα σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου, αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί σε αδενοκαρκινώματα σιελογόνου αδένου [178]. Στην παρούσα μελέτη, η προγνωστική σημασία του PELP1/MNAR αξιολογήθηκε στους υποπληθυσμούς ER β -θετικών και αρνητικών όγκων. Η υπερέκφραση του PELP1/MNAR διατήρησε τον ανεξάρτητο ευνοϊκό προγνωστικό χαρακτήρα σε ER β -θετικά αδενοκαρκινώματα. Ενδεχομένως, ο PELP1/MNAR να ενέχεται σε ER β -διαμεσολαβούμενη μιτογόνο δραστηριότητα, διατηρώντας παράλληλα ένα λιγότερο επιθετικό κυτταρικό φαινότυπο. Ωστόσο, ο PELP1/MNAR έχει συσχετιστεί με αδιαφοροποίητο αδενοκαρκίνωμα μαστού [177], εύρημα που υποστηρίζει ενδεχόμενη διαφορετική προγνωστική σημασία σε διακριτούς ιστούς. Επιπλέον, πυρηνική σε σχέση με κυτταροπλασματική εντόπιση του παράγοντα και διαντίδραση (cross-talk) με ποικίλα μεταγωγικά μονοπάτια επηρεάζουν τη βιολογική του ενεργότητα. Η κυτταροπλασματική εντόπισή του σε καρκινικά κύτταρα μαστού φαίνεται να αυξάνει την ευαισθησία σε κυτταρική απόπτωση προκαλούμενη από τον TNF α . Υπερέκφραση του PELP1/MNAR στο κυτταρόπλασμα έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, μειωμένη πρόσδεση του NF-kB στο DNA καθώς και με αυξημένα επίπεδα έκφρασης cyclin E [179]. Αξιοσημείωτα, ο PELP1/MNAR, ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής του, δρα και ως συνκαταστολέας

ειδικών πυρηνικών παραγόντων εκτός του οιστρογονικού υποδοχέα [127], λειτουργώντας άλλοτε ως ευνοϊκός και άλλοτε ως δυσμενής προγνωστικός παράγοντας. Ο προγνωστικός ρόλος του PELP1/MNAR δεν επαληθεύτηκε στα ERβ-αρνητικά αδενοκαρκινώματα, ωστόσο ο αριθμός τους δεν ήταν επαρκής για την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος (underpowered).

Ο ρόλος της έκφρασης του συμπαραγόντα AIB1 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο Amplified in Breast Cancer 1 (AIB1) συνιστά έναν ιδιαίτερα σημαντικό συνενεργοποιητή του οιστρογονικού υποδοχέα, ο οποίος διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής δράσης των οιστρογόνων. Στην παρούσα μελέτη, η πρωτεΐνη AIB1 ανιχνεύτηκε στο 61.5% των δειγμάτων φυσιολογικού βλεννογόνου, σε όλα τα αδενώματα και στο 96.3% των αδενοκαρκινωμάτων. Η ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη AIB1 ανιχνεύτηκε στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων, αντίστοιχα με την εντόπισή της σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Ωστόσο, ασθενής κυτταροπλασματική ανοσοχρώση έχει περιγραφεί σε αδενοκαρκινώματα μαστού και ενδομητρίου [180, 181]. Στην παρούσα μελέτη, ασθενής κυτταροπλασματική ανοσοχρώση για τον AIB1 ανιχνεύτηκε στα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά δεν αξιολογήθηκε στα πλαίσια στατιστικής ανάλυσης, διότι ήταν ετερογενής και μη πλήρης. Προηγούμενη μελέτη ανέδειξε την έκφραση της πρωτεΐνης AIB1 στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου [182]. Η πυρηνική εντόπιση φαίνεται να αναδεικνύει τη συμμετοχή του συνενεργοποιητή στις γονιδιωματικές επιδράσεις των οιστρογόνων. Στον πυρήνα του κυττάρου, ο AIB1 λειτουργεί ως πρωτεΐνη «κλειδί» στη διαδικασία «ολοκλήρωσης» ποικίλων ενδοκυττάρων μηνυμάτων (cointegrator), επιδρώντας ενεργά στη λήψη καίριων κυτταρικών «αποφάσεων». Δηλαδή, ο AIB1 σταθμίζει επιμέρους

συγκεντρώσεις διαφόρων συμπαράγοντων, διαντιδρά με μοτίβα ειδικών μεταγραφικών παραγόντων και «καθοδηγεί» τον οιστρογονικό υποδοχέα στον υποκινητή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης AIB1 βρέθηκαν να αυξάνουν σημαντικά στα αδενώματα και τα αδενοκαρκινώματα έναντι του φυσιολογικού βλεννογόνου. Το εύρημα αυτό ίσως υποδηλώνει πιθανό ρόλο του παράγοντα στη διαδικασία καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Παρόμοια ευρήματα έχουν περιγραφεί σε άλλα αδενοκαρκινώματα, όπως του μαστού [180], του ενδομητρίου [181] και του παγκρέατος [183]. Μέτρια υπερέκφραση του AIB1 φαίνεται να αναπαριστά μία από τις πιο σημαντικές προνεοπλασματικές μεταβολές στο μαζικό αδέν. Συγκεκριμένα, εντοπιζόμενος στον πυρήνα κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, ο παράγοντας αυξάνει τα επίπεδα της κυκλίνης D1, προάγοντας με τον τρόπο αυτό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [184]. Η «διασυνομιλία» (cross-talk) ανάμεσα στον παράγοντα AIB1 και το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR φαίνεται να ενέχεται στην κυτταρική αύξηση των προστατικών κυττάρων [185]. Σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων σε επίμυες, η αναστολή του AIB1 σε καρκινικά κύτταρα με τη χρήση RNAi knockdown ή ribozymes οδηγεί σε ιδιαίτερα σημαντική μείωση των όγκων [186, 187]. Παράλληλα στα ίδια μοντέλα, η ανεπάρκεια του AIB1 δύναται να καταστείλλει την ανάπτυξη των όγκων [188]. Επομένως, ο AIB1 μπορεί να θεωρηθεί σημαντικός στόχος για την ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών ουσιών στον καρκίνο (χημειοπρόληψη).

Σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του συμπαράγοντα AIB1 και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων της νόσου δεν παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, υπερέκφραση της πρωτεΐνης AIB1 συσχετίστηκε σημαντικά

με τοπικά προχωρημένη νόσο. Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με δεδομένα από προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, τα οποία συσχέτισαν την υπερέκφραση του AIB1 με προχωρημένο στάδιο της νόσου [182]. Σε κλινική μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο οισοφάγου, υπερέκφραση του AIB1 παρατηρήθηκε πιο συχνά σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένη νόσο (T3/T4 έναντι T1/T2), αλλά δε συσχετίστηκε με τη διήθηση λεμφαδένων [189]. Σε μοντέλο καρκίνου του μαστού σε επίμυες, η πρωτεΐνη AIB1 ανιχνεύτηκε στην περιφέρεια του όγκου, σε υποπεριοχή πιο ενεργού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και περιορισμένης διαφοροποίησης [190]. Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι ο AIB1 προάγει τη διηθητική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων αυξάνοντας την έκφραση ειδικών ενζύμων (μεταλλοπρωτεασών), τα οποία διασπούν τη μεσοκυττάρια ουσία [191]. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ίσως αναδεικνύουν τη σημασία του AIB1 στην τοπική ανάπτυξη των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου.

Σε μελέτη ασθενών με αδενοκαρκινώματα μαστού υπό θεραπεία με το αντι-οιστρογόνο ταμοξιφαίνη, η υπερέκφραση του AIB1 δε βρέθηκε να συσχετίζεται με υποτροπή της νόσου [192], ενώ η ενίσχυση του γονιδίου AIB1 δε συσχετίστηκε με τη συνολική επιβίωση. Ωστόσο στην ίδια μελέτη, η υπερέκφραση του AIB1 συσχετίστηκε με υποτροπή της νόσου σε μια υποομάδα ασθενών με αδενοκαρκινώματα που υπερέκφραζαν τους υποδοχείς HER2 και HER3, υπογραμμίζοντας την κλινική σημασία της διασυννομιλίας (cross-talk) ανάμεσα στα σηματοδοτικά μονοπάτια του οιστρογονικού υποδοχέα και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Επίσης, σε μελέτη ασθενών με ουροθηλιακά καρκινώματα περιγράφηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα σε υπερέκφραση του AIB1 στον όγκο και σε χαμηλή επιβίωση των ασθενών [193]. Στην

παρούσα μελέτη, η υπερέκφραση του AIB1 βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας, συσχετιζόμενος με μεγαλύτερη επιβίωση και μειωμένη πιθανότητα υποτροπής. Το εύρημα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, διότι η υπερέκφραση του AIB1 συσχετίστηκε με τοπικά προχωρημένη νόσο. Υπάρχει ένας αριθμός υποθετικών εξηγήσεων για την ερμηνεία αυτού του ευρήματος. Πρώτον, η υπερέκφραση του AIB1 παρατηρήθηκε πιο συχνά σε αδενοκαρκινώματα χωρίς διηθημένους λεμφαδένες συγκριτικά με εκείνα που συνοδεύονταν από λεμφαδενική διήθηση. Η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, αλλά μελέτη σε περισσότερους ασθενείς ενδεχομένως να αναδείξει συσχέτιση ανάμεσα σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του AIB1 και μειωμένη πιθανότητα λεμφαδενικής διήθησης. Με δεδομένο ότι η πρόγνωση και θεραπεία της νόσου συσχετίζεται περισσότερο με λεμφαδενική διήθηση (N στάδιο) συγκριτικά με τοπική διήθηση (T στάδιο), η διερεύνηση τη έκφρασης του AIB1 αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Επιπλέον, η μοριακή «αφθονία» της πρωτεΐνης AIB1 στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση/αναστολή εναλλακτικών μονοπατιών, όπως το μονοπάτι της πρωτεΐνης p53 [182], συντελώντας σε διαφορετικές εκβάσεις στα πλαίσια διαφορετικών συνθηκών. Ακόμη, η διαντίδραση του AIB1 με το μονοπάτι του παράγοντα NF-kB φαίνεται να ασκεί προστατευτικό ρόλο ενάντια στην ανάπτυξη λεμφωμάτων από B-κύτταρα, υπογραμμίζοντας τον υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας και «πλαστικότητας» των μοριακών δικτύων σε διακριτά υποκυτταρικά πλαίσια [194].

Ο ρόλος της έκφρασης του συμπαραγόντα TIF2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο transcriptional intermediary factor 2 (TIF2) αποτελεί έτερο σημαντικό συνενεργοποιητή του οιστρογονικού υποδοχέα, με ρόλο κυρίως στη μεταγραφική δράση

του. Στην παρούσα μελέτη η πρωτεΐνη TIF2 ανιχνεύτηκε στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων σε όλα τα ιστικά δείγματα. Επίσης, ασθενής κυτταροπλασματική ανοσοχρώση για τον TIF2 ανιχνεύτηκε στα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά δεν αξιολογήθηκε στα πλαίσια στατιστικής ανάλυσης, διότι δεν ήταν ομοιογενής και πλήρης. Κυτταροπλασματική ανοσοχρώση για τον TIF2 έχει περιγραφεί σε καρκινικά κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος [195]. Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TIF2 βρέθηκαν να αυξάνουν σημαντικά από το φυσιολογικό βλεννογόνο, στα αδενώματα και τα αδενοκαρκινώματα, υποδεικνύοντας πιθανή συμμετοχή του παράγοντα στην πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης. Σε μελέτη ασθενών με αδενοκαρκίνωμα μαστού, τα επίπεδα TIF2 mRNA, μετρημένα με τη μέθοδο RT-PCR, βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα σε αδενοκαρκινώματα συγκριτικά με τα δείγματα φυσιολογικού μαστικού αδένου [196]. Αντίστροφα, σε μελέτη ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, τα επίπεδα TIF2 mRNA βρέθηκαν να μειώνονται από τα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου σε αδενοκαρκινώματα [136]. Τέτοιες διαφοροποιήσεις μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική φύση των επιμέρους χρησιμοποιούμενων τεχνικών καθώς και των βιολογικών χαρακτηριστικών των υπό μελέτη ασθενών. Σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του συμπαραγόντα TIF2 και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων τη νόσου δεν παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Σε προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του μαστού, η έκφραση της πρωτεΐνης TIF2 συσχετίστηκε με τη διήθηση λεμφαδένων [180]. Η παρούσα μελέτη φαίνεται να είναι η πρώτη που διερευνά την προγνωστική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης TIF2 σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου.

Ο ρόλος της ταυτόχρονης έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα και των συνενεργοποιητών AIB1 και TIF2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών ER β , AIB1 και TIF2 από το φυσιολογικό στον καρκινικό βλεννογόνο υποδηλώνει πιθανή συνδυαστική σημασία των πρωτεϊνών στη διαδικασία καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Έχειδειχθεί ότι η διαντίδραση του ER α με τον AIB1 υπό την επίδραση οιστρογόνων σε καρκινικά κύτταρα μαστού οδηγεί σε ενεργοποίηση της κυκλίνης D1 και κυτταρικό πολλαπλασιασμό [197]. Σε προηγούμενη μελέτη ασθενών με αδenoκαρκίνωμα μαστού παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων έκφρασης mRNA του ER β και του AIB1 [196]. Σε άλλη μελέτη ασθενών με την ίδια νόσο, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ER β και TIF2 [180]. Επιπλέον, σε αδenoκαρκινώματα του μαστού η σηματοδοτική και μεταγραφική δραστηριότητα του ER β φαίνεται να ενεργοποιείται από το ογκογονίδιο Akt μέσω φωσφορυλίωσης του συνενεργοποιητή TIF-2 [141], αναδεικνύοντας τη σημασία της δυναμικής διαντίδρασης ανάμεσα στα μεταγωγικά μονοπάτια. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών AIB1 και TIF-2 σε αδenoκαρκινώματα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα πρότυπα έκφρασης του ER β και των δύο συνενεργοποιητών στα δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου και καρκινικού ιστού. Το εύρημα αυτό ενισχύει δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι ενεργότητες των δύο συνενεργοποιητών δεν επηρεάζουν μόνο τον οιστρογονικό υποδοχέα, αλλά και ποικίλες μη ορμονικά-εξαρτώμενες διαδικασίες μέσα στο κύτταρο [198-200]. Τέτοιες πλειοτροπικές δράσεις των δύο συν-ενεργοποιητών ερμηνεύουν τον πολυπαραγοντικό και πολύπλοκο

χαρακτήρα της έκφρασής τους τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και κατά τη διάρκεια της κακοήθους κυτταρικής εξαλλαγής.

Συνδυασμένη έκφραση βιοδεικτών στον καρκίνο του παχέος εντέρου - «ολιστική θεώρηση»

Με δεδομένο ότι οι υπό μελέτη παράγοντες συνιστούν συστατικά κομβικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και του οιστρογονικού υποδοχέα, διερευνήθηκε η παρουσία συνέκφρασης βιοδεικτών στα αδενοκαρκινώματα καθώς και ο πιθανός ρόλος αυτής στην πρόγνωση της νόσου. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του ER β και του PELP1/MNAR και μεταξύ του AIB1 και του TIF2. Επιπλέον, σημαντική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του AIB1 και του PELP1/MNAR. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη που αναδεικνύει τέτοια συσχέτιση στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Δεδομένα από μελέτη στον καρκίνο του μαστού αναδεικνύουν συσχέτιση στην έκφραση των πρωτεϊνών AIB1 και PELP1/MNAR, οι οποίες βρέθηκαν να συνεκφράζονται στην περιφέρεια του όγκου, σε περιοχές ενεργού πολλαπλασιασμού και περιορισμένης κυτταρικής διαφοροποίησης, με αραιότερη έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα [190].

Επίσης, στα αδενοκαρκινώματα τα επίπεδα έκφρασης του κυτταροπλασματικού HER3 παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με εκείνα των συνενεργοποιητών AIB1, TIF2 και PELP1/MNAR. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που αναδεικνύει τέτοια συσχέτιση στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα συγκεκριμένα ευρήματα πιθανώς αναδεικνύουν τη συνεχή και πολυδιάστατη αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών (cross-talk), υποδηλώνοντας ενδεχομένως ότι οι συνενεργοποιητές του

οιστρογονικού υποδοχέα επηρεάζουν και επηρεάζονται από επιδράσεις του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Δεδομένα από καρκινικές κυτταρικές σειρές (*in vitro*) υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του οιστρογονικού υποδοχέα δύναται να διαμεσολαβείται από το MAPK μεταγωγικό μονοπάτι, δίχως την πρόσδεση ορμονών, αντανakλώντας την επίδραση αυξητικών παραγόντων [201]. Επιπρόσθετα, ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση του οιστρογονικού υποδοχέα δύναται να επάγεται από τον EGFR και προϋποθέτει τη φωσφορυλίωση του AIB1 [202]. Τέτοια ομοιοπολική τροποποίηση έχει ρόλο στη ρύθμιση γενωμικών αποκρίσεων του οιστρογονικού υποδοχέα σε πολλαπλά ακόμη μη ορμονικά εξωκυττάρια σήματα, όπως σε αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες [203]. Αντίστοιχες κωδικοποιημένες βιοχημικές αντιδράσεις στοχεύουν στη στρατολόγηση περαιτέρω ειδικών παραγόντων με αποτέλεσμα την ειδική μεταγραφική δραστηριότητα. Ωστόσο, σημαντική άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του κυτταροπλασματικού HER3 και του οιστρογονικού υποδοχέα β δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Ακολούθως, ποικίλλοι συνδυασμοί (υπερ)έκφρασης βιοδεικτών διερευνήθηκαν ως προς την πιθανή τους επίδραση σε κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου. Ασθενείς με αδενοκαρκινώματα θετικά ως προς την έκφραση του κυτταροπλασματικού HER3 και ταυτόχρονη υπερέκφραση του AIB1 παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό θανάτων και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση σε σχέση με ασθενείς με αδενοκαρκινώματα χωρίς αυτά τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η ακριβής σημασία και η εξήγηση αυτού του ευρήματος απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Δεν είναι γνωστό αν οφείλεται στον ενδεχόμενο ευνοϊκό προγνωστικό χαρακτήρα του AIB1 ή αν σχετίζεται με συνδυασμένη βιολογική επίδραση των δύο παραγόντων στους

κυτταρικούς μηχανισμούς. Η συνδυασμένη έκφραση των δύο πρωτεϊνών σε αδενοκαρκινώματα του μαστού ασθενών που έλαβαν το αντι-οιστρογόνο ταμοξιφαίνη είχε δυσμενή προγνωστική σημασία [192]. Προοπτικές μελέτες με αντίστοιχα μεγάλο αριθμό ασθενών απαιτούνται για τη διευκρίνιση του ρόλου της συνδυασμένης (υπερ)έκφρασης βιοδεικτών.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα κατά τη διερεύνηση έτερων συνδυασμών βιοδεικτών, αλλά ορισμένα ευρήματα θεωρούνται αξιοσημείωτα. Αδενοκαρκινώματα θετικά ως προς την έκφραση του ER β και του κυτταροπλασματικού HER3 παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπών και μικρότερο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή της νόσου από εκείνα χωρίς ταυτόχρονη έκφραση των δύο πρωτεϊνών. Το εύρημα αυτό αποκτά μεγαλύτερο ενδιαφέρον, δεδομένης της απουσίας σημαντικής συσχέτισης στα επίπεδα έκφρασης των δύο πρωτεϊνών. Ενδεχομένως, η ταυτόχρονη παρουσία των δύο πρωτεϊνών υποδηλώνει ενεργοποίηση διακριτών μονοπατιών τα οποία οδηγούν σε απορύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και περαιτέρω κυτταρική εξαλλαγή (tumor progression). Επιπλέον, η υπερέκφραση του PELP1/MNAR σε HER3 θετικά αδενοκαρκινώματα οδήγησε σε αυξημένη συνολική επιβίωση. Το ίδιο συνέβη σε ER β θετικά αδενοκαρκινώματα με υπερέκφραση του PELP1/MNAR, υποδηλώνοντας ενδεχομένως πιθανό ευνοϊκό προγνωστικό ρόλο του οιστρογονικού συνενεργοποιητή.

Στην εποχή της “δίκτυακής ιατρικής”, ο μεγάλος βαθμός πολυπλοκότητας των δράσεων του οιστρογονικού υποδοχέα, η δυναμική διαντίδραση και διασυνομιλία (cross-talk) ανάμεσα σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως εκείνα που ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες, καθιστούν τη στόχευση συγκεκριμένων συνενεργοποιητών ένα ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα. Αναλυτική περιγραφή των

επιμέρους δράσεων διαφορετικών συνενεργοποιητών και συνκαταστολέων του οιστρογονικού υποδοχέα θα συντελέσει στην «ολιστική θεώρηση» και αποκρυπτογράφηση του μοριακού δικτύου, το οποίο χαρακτηρίζει το ρόλο ορμονικών και αυξητικών παραγόντων στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή-σκοπός

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί ένα από τα συχνότερα κακοήθη νεοπλάσματα παγκοσμίως, προκαλώντας σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Η συστηματική διερεύνηση της παθογένειας συντελεί σημαντικά στην πρόληψη, έγκαιρη διάγνωση, θεραπεία και πρόγνωση της νόσου. Στην εποχή της μοριακής ιατρικής, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών καρκινογένεσης έχει αναδείξει το ρόλο ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν κυτταρικές διαδικασίες, όπως πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, απόπτωση, αγγειογένεση, διήθηση. Κομβικά συστατικά τέτοιων μοριακών δικτύων αποτελούν οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως ο Human Epidermal Receptor-1 (HER-1/EGFR), ο ρόλος του οποίου έχει τεκμηριωθεί στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, επιτείνοντας το ενδιαφέρον στη διεκρίνιση του ρόλου γειτονικών υποδοχέων, όπως του Human Epidermal Receptor-3 (HER-3). Ο HER-3 συνιστά μεμβρανικό υποδοχέα που συμμετέχει σε μοριακά μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Επομένως, ποσοτικές μεταβολές στην έκφρασή του αλλά και ποιοτικές αλλαγές στη δομή του, συντελούν δυνητικά στην κυτταρική εξαλλαγή. Τα δεδομένα από τη μελέτη του HER-3 στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου είναι περιορισμένα και ο ρόλος του στην παθογένεια, πρόγνωση και θεραπεία της νόσου παραμένει ασαφής.

Αντίστοιχα με τους μεμβρανικούς υποδοχείς, πυρηνικοί υποδοχείς ενέχονται σε διαδικασίες ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ER) α και β διαμεσολαβούν την επίδραση των οιστρογόνων σε κυτταρικό επίπεδο, μεταποιώντας τα επίπεδα των ορμονών σε μεταβολές γονιδιακής έκφρασης. Οι διαφορές στην επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου ανάμεσα στα δύο φύλα καθώς και πρόσφατα

βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν αναδείξει τη σημασία της έκφρασης αυτών των υποδοχέων στην καρκινογένεση του παχέος έντερου. Παράλληλα, η εξειδίκευση της οιστρογονικής δράσης σε επίπεδο ιστού και κυττάρου εξασφαλίζεται μέσω της δράσης συγκεκριμένων συμπαράγοντων (ενεργοποιητών/καταστολέων). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι συνδεόμενοι με τους οιστρογονικούς αλλά και άλλους υποδοχείς «εξατομικεύουν» την ορμονική επίδραση στο γονιδίωμα. Ο proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein 1 (PELP1), γνωστός και ως modulator of non-genomic activity of ER (MNAR), ο amplified in breast cancer-1 (AIB1) και ο transcriptional intermediary factor-2 (TIF2) είναι σημαντικοί συμπαράγοντες οιστρογονικών υποδοχέων, με συνέπεια η μελέτη τους να αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της διερεύνησης οιστρογονο-εξαρτώμενων μηχανισμών.

Η συνεχής αλληλεπίδραση HER- και ER-εξαρτώμενων μονοπατιών έχει περιγραφεί σε ποικίλους ιστούς. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου της (υπερ)έκφρασης του μεμβρανικού υποδοχέα HER-3, των οιστρογονικών υποδοχέων (ER) και των συμπαράγοντων PELP1/MNAR, AIB-1 και TIF-2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ιστικά δείγματα, μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εκλεισμένα σε παραφίνη από 140 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Η έκφραση των επιπέδων HER-3 mRNA εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) σε 54 αδενοκαρκινώματα και 29 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Η έκφραση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης (pHER-3) και μη φωσφορυλιωμένης HER-3 πρωτεΐνης εκτιμήθηκε

με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας σε 110 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου, 24 αδενώματα και 140 αδеноκαρκινώματα. Η έκφραση των επιπέδων του οιστρογονικού υποδοχέα α και β και του PELP1/MNAR εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας σε 113 αδеноκαρκινώματα, 30 αδενώματα και 88 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου. Αντίστοιχα η έκφραση των επιπέδων του AIB1 και TIF-2 εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας σε 110 αδеноκαρκινώματα, 30 αδενώματα και 83 δείγματα φυσιολογικού βλεννογόνου.

Αποτελέσματα

Η πρωτεΐνη HER-3 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδеноκαρκινώματα και φαίνεται να μεταβάλλεται τοπογραφικά (από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα) κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ωστόσο, η έκφραση της πρωτεΐνης HER-3 σε αδеноκαρκινώματα δε φαίνεται να συσχετίζεται σημαντικά με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης HER-3 (pHER-3) εκφράζεται στον πυρήνα και τη μεμβράνη επιθηλιακών και λείων μυικών κυττάρων παχέος εντέρου σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδеноκαρκινώματα. Η πυρηνική έκφραση pHER-3 δε διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε φυσιολογικό βλεννογόνο, αδενώματα και αδеноκαρκινώματα. Ωστόσο, αυξημένα επίπεδα πυρηνικής έκφρασης pHER-3 συσχετίζονται σημαντικά με μεγαλύτερο στάδιο της νόσου, χωρίς να συσχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης της μη φωσφορυλιωμένης μορφής. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HER-3 δε φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά κατά την καρκινογένεση. Ωστόσο, αυξημένα επίπεδα HER-3 mRNA στα αδеноκαρκινώματα σχετίζονται με μεγαλύτερη ηλικία των ασθενών, εντόπιση του

όγκου στο αριστερό κόλον και το ορθό και με λεμφαδενική διήθηση. Επίσης, συχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου και μειωμένο χρονικό διάστημα ως την υποτροπή.

Ο ERα εκφράζεται σπάνια στο παχύ έντερο σε αντίθεση με τον ERβ, ο οποίος εκφράζεται συχνά στον πυρήνα επιθηλιακών αλλά και στρωματικών κυττάρων. Η έκφραση της πρωτεΐνης ERβ καθίσταται πιο έντονη κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης σε άνδρες, και στα αδενοκαρκινώματα συσχετίζεται με την πιθανότητα υποτροπής της νόσου. Ο συμπαράγοντας PELP1/MNAR ανιχνεύεται στον πυρήνα επιθηλιακών αλλά και στρωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου και η έκφρασή του αυξάνει κατά την καρκινογένεση και στα αδενοκαρκινώματα συσχετίζεται με την έκφραση του ERβ. Ωστόσο, η υπερέκφραση του PELP1/MNAR στα ERβ θετικά αδενοκαρκινώματα συσχετίζεται με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση των ασθενών.

Ο AIB1 και ο TIF2 ανιχνεύονται στον πυρήνα επιθηλιακών αλλά και στρωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η έκφραση του AIB1 αυξάνει κατά την καρκινογένεση και συσχετίζεται με τοπική ανάπτυξη του όγκου. Ωστόσο, στην πολυπαραγοντική ανάλυση ο AIB1 αναδεικνύεται ως ανεξάρτητος ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας ως προς τη συνολική επιβίωση. Η έκφραση του TIF2 αυξάνει κατά την καρκινογένεση και στα αδενοκαρκινώματα συσχετίζεται με την έκφραση του AIB1. Ωστόσο, η έκφρασή του στα αδενοκαρκινώματα δε σχετίζεται με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου. Το πρότυπο έκφρασης των συμπαράγοντων AIB1 και TIF2 δε σχετίζεται σημαντικά με εκείνο του ERβ.

Συζήτηση-συμπεράσματα-προοπτικές

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει τη σημασία της έκφρασης και φωσφορυλίωσης του HER3 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, υποστηρίζοντας τον πιθανό ρόλο τους στην πρόγνωση της νόσου. Τα ευρήματα της μελέτης συμφωνούν με συγκεκριμένα βιβλιογραφικά δεδομένα ως προς τη συχνότητα ανίχνευσης του υποδοχέα στον παχύ έντερο, ενώ είναι η πρώτη η οποία αναδεικνύει τα επίπεδα HER-3 mRNA ως πιθανό προγνωστικό βιοδείκτη.

Η διερεύνηση της έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα β (ER β 1) ανέδειξε αύξηση των επιπέδων του κατά την καρκινογένεση, εύρημα που βρίσκεται σε συμφωνία με μερικά και σε αντιδιαστολή με άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα. Η προγνωστική σημασία της έκφρασης των πυρηνικών υποδοχέων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως τα επίπεδα ειδικών συμπαράγοντων, ομοιοπολικές τροποποιήσεις, την τοπογραφία τους μέσα στο κύτταρο και τα επίπεδα συγκεκριμένων συγκεντρώσεων προσδέτη/ορμόνης. Η αύξηση των επιπέδων των συμπαράγοντων του οιστρογονικού υποδοχέα PELP1/MNAR, AIB1 και TIF2 κατά την καρκινογένεση υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή τους σε οιστρογονοεξαρτώμενη ογκογόνο σηματοδότηση. Ωστόσο, η απουσία ισχυρής συσχέτισης ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασής τους και στα επίπεδα έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα (ER β 1) υπογραμμίζει την πλειοτροπική τους δράση και τον επιπρόσθετο ρόλο τους σε οιστρογονο-ανεξάρτητη ενδοκυττάρια σηματοδότηση.

Περισσότερες μελέτες σε μεγάλο αριθμό ασθενών, κατάλληλα σχεδιασμένες και εκτελεσμένες, με τη χρήση ευαίσθητων και ειδικών πειραματικών τεχνικών καθώς και μεθόδων στατιστικής ανάλυσης απαιτούνται για την επιβεβαίωση των ευρημάτων της

παρούσας μελέτης. Στην εποχή της μεταγονιδιωματικής ιατρικής, η αναζήτηση χρήσιμων μοριακών βιοδεικτών δύναται να συντελέσει στη βελτίωση της πρόγνωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

SUMMARY

Introduction

Colorectal cancer is a major cause of cancer-related morbidity and mortality in the western world and has a significant impact on the health care systems. The deep understanding of molecular mechanisms that underline cellular transformation and tumor progression leads to the identification of key-molecules that are appropriate targets for sophisticated therapy in cancer. One such targeted approach exploits the presence of specific biomarkers that could be considered essential for tumor development. The role of such a biomarker, Human Epidermal Receptor-1 (HER-1/EGFR), has been established in the development of colorectal cancer, suggesting the potential involvement of neighboring receptors, such as Human Epidermal Receptor-3 (HER-3). HER-3 is a membranic receptor implicated in intracellular cell proliferation signaling. Thus, quantitative modifications in its expression and/or qualitative changes in its structure may contribute to cellular malignant transformation. The significance of HER3 expression, localization and phosphorylation remains elusive and data regarding its role in the pathogenesis, diagnosis, prognosis and management of colorectal cancer is limited.

Apart from their mebranic counterparts, nuclear receptors are implicated in the regulation of gene transcription. Estrogen receptors (ER) α and β mediate the estrogen actions in the subcellular microenvironment. Differences in the incidence of colorectal cancer in the two genders have underlined the significance of ER expression in colorectal carcinogenesis. The specificity of estrogen activities in various cell types is mediated by the presence of tissue-specific coregulators (coactivators/corepressors). These proteins

are specific transcription factors that bind to nuclear receptors, orchestrating their actions on the genome. Frequently, such coregulators are located in the cytoplasm, regulating the non genomic activity of the estrogens. Proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein 1 (PELP1), also known as modulator of non-genomic activity of ER (MNAR), amplified in breast cancer-1 (AIB1) and transcriptional intermediary factor-2 (TIF2) are considered major ER-coregulators. Thus, the investigation of their expression is inherent to the evaluation of estrogen-mediated mechanisms.

The dynamic cross-talk between HER- and ER-driven signaling pathways has been described. The aim of this study is the investigation of the role of HER3, ER and coregulators PELP1/MNAR, AIB-1, TIF-2 (over)expression in the pathogenesis and prognosis of colorectal cancer.

Material and Methods

Sections from formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal tissue blocks, derived from 140 patients with colorectal cancer, were used. HER-3 mRNA levels of expression were assessed by quantitative RT-PCR in 54 colorectal adenocarcinomas and 29 normal mucosa specimens. The expression levels of both phosphorylated and unphosphorylated HER-3 protein were assessed by immunohistochemistry in 110 normal mucosa specimens, 24 adenomas and 140 adenocarcinomas. The expression levels of ER α and β , PELP1/MNAR were assessed by immunohistochemistry in 88 normal mucosa specimens, 30 adenomas and 113 adenocarcinomas. Additionally, the expression levels of AIB1 and TIF-2 protein were assessed by immunohistochemistry in 83 normal mucosa specimens, 30 adenomas and 110 adenocarcinomas.

Results

HER-3 was detected both in the cytoplasm and nucleus, whereas pHER-3 was observed in the nucleus and membrane of cells. A possible switch in HER-3 topography from the nucleus to the cytoplasm during colorectal tumorigenesis is suggested. The expression of pHER-3 did not differ significantly in normal tissue, adenomas and carcinomas, but was related to disease stage. HER-3 mRNA overexpression was significantly associated with decreased time to disease progression. It was also correlated with higher median age, left colon and rectal tumour sites and lymph node involvement.

ER α expression was extremely rare in colorectal tissue of our cohort and its expression did not appear to be associated with colorectal carcinogenesis. ER β and PELP1/MNAR were detected in the nucleus of epithelial, endothelial, inflammatory, smooth muscle cells and myofibroblasts. When intensity of staining was taken into account, the expression of both proteins was significantly increased in epithelial cells of carcinomas compared to normal mucosa. ER β expression in epithelial cells was correlated with decreased disease progression-free survival. PELP1/MNAR overexpression in epithelial cells was found to be an independent favorable prognostic factor.

AIB1 and TIF2 were detected in the nucleus of epithelial, endothelial, inflammatory, smooth muscle cells and myofibroblasts. The expression of both proteins was significantly increased in epithelial cells of carcinomas compared to normal mucosa. In carcinomas, a significant correlation between the levels of expression of AIB1 and TIF2 was noted, but there was no correlation between the expression patterns of these two proteins and ER β . Although AIB1 overexpression was associated with local tumor

invasion, it was also found to correlate independently with prolonged overall survival. TIF2 overexpression did not appear to correlate with clinicopathological parameters.

Conclusion/Discussion

This study highlights the significance of HER3 expression and phosphorylation in colorectal carcinogenesis, supporting also its potential prognostic significance. This study supports literature data regarding HER3 expression in colorectal tissue, while is the first to imply a possible prognostic significance of HER-3 mRNA expression levels and to suggest a topographic switch of HER3 protein during colorectal carcinogenesis.

ER β 1 protein levels were found to increase during colorectal carcinogenesis, a finding which corresponds only to a small portion of literature data. The prognostic role of nuclear receptors depends on a number of factors, such as coregulator expression levels, chemical modifications, subcellular localization and ligand/hormone levels. The concomitant increase in the expression levels of coregulators PELP1/MNAR, AIB1 and TIF2 during colorectal carcinogenesis might imply their potential participation in estrogen-mediated signaling. However, the characteristic absence of strong correlation between their expression pattern and ER β 1 expression pattern underlines their pluripotent role and their possible contribution to estrogen-independent signaling.

Further studies with a large number of patients, appropriately designed and conducted using sensitive experimental and statistical methods, are required for the confirmation of our hypothesis generation results. In the post-genomic era, identification of useful molecular biomarkers might contribute to the improvement of the management and prognosis of patients with colorectal cancer.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zhong YF, Butts T, Holland PW. HomeoDB: a database of homeobox gene diversity. *Evol Dev* 2008;10(5):516-8.
2. Hay D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
3. Bach SP, Renehan AG, Potten CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000;21:469-76.
4. Lipkin M, Bell B, Shelrock P. Generation time of epithelial cells in the human colon. *Nature* 1962;195:175-7.
5. Shorter RG, Moertel CG, Titus JL. Cell kinetics in the jejunum and rectum of man. *Am J Dig Dis* 1964;9:760-3.
6. Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, Guetter A, Runquist OA. How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer. *Cancer Res*. 2008;68(9):3304-13
7. Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2828-38.
8. Gray Henry (thoroughly revised and re-edited by Warren H. Lewis). *Anatomy of the human body*, 20th edition; XI. Splanchnology; 2h: The Large Intestine. © 2000 Copyright Bartleby.com, Inc.
9. Barrett Kim E. *Gastrointestinal Physiology*. Chapter 5: Water and Electrolyte Absorption and Secretion. Copyright © 2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.
10. Junqueira LC, Carneiro J, "Chapter 15. Digestive Tract" (Chapter). Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text and Atlas*, 11th Edition: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=710949>.
11. Liang JJ, Alrawi S, Tan D. Nomenclature, molecular genetics and clinical significance of the precursor lesions in the serrated polyp pathway of colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008;1(4):317-24.
12. Rubin. *Clinical Oncology*, 8th ed. Chapter 27:Alimentary cancer; Colon and Rectum, etiology. Copyright © 2001 W. B. Saunders Company.
13. Feinberg AP, Vogelstein B: Alterations in DNA methylation in human neoplasia. *Semin Surg Oncol* 1987; 3:149-151.
14. Winawer SJ, et al. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996; 334(20):1339-40.
15. Siewert E, Tietze L, Maintz C, Geier A, Dietrich CG, Matern S, Gartung C. Gastrointestinal stromal tumors: a broad clinical spectrum from incidental -discovery to acute gastrointestinal bleeding. *Z Gastroenterol*. 2004;42(3):233-42.
16. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.
17. Boyle P, Langman J S. *Student BMJ*. 2000;08:435-476.
18. *Cancer Medicine* 6. Section 28: Gastrointestinal Tract; 106. Adenocarcinoma of the Colon and Rectum; *Epidemiology of Colorectal Cancer*. © 2003 BC Decker Inc.
19. Ballesté B, Bessa X, Piñol V, et al. Detection of metachronous neoplasms in colorectal cancer patients: identification of risk factors. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(7):971-80.

20. Slattery ML, Edwards SL, Boucher KM, et al. Lifestyle and colon cancer: An assessment of factors associated with risk. *Am J Epidemiol* 1999;150:869–877.
21. Stattin P, Lukanova A, Biessy C, et al. Obesity and colon cancer: Does leptin provide a link? *Int J Cancer* 2004;109:149–152.
22. Arber N, Levin B. Chemoprevention of colorectal neoplasia: the potential for personalized medicine. *Gastroenterology*. 2008;134(4):1224-37.
23. Canderelli R, Leccesse LA, Miller NL, Unruh Davidson J. Benefits of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Am Acad Nurse Pract* 2007;19(12):635-41.
24. Burner GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, et al. Neoplastic progression in ulcerative colitis: Histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 1992;103:1602–1610.
25. Itzkowitz S. Colon carcinogenesis in inflammatory bowel disease: Applying molecular genetics to clinical practice. *J Clin Gastroenterol* 2003;36(5 Suppl):S70–S74.
26. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992;1: 229-33.
27. Midgley CA, White S, Howitt R, et al. APC expression in normal human tissues. *J Pathol* 1997;181:426-33.
28. van Es JH, Giles RH, Clevers HC. The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res* 2001; 264:126-34.
29. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993;262:1731-4.
30. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, et al. Identification of c-myc as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-12.
31. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-6.
32. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/b-catenin/TCF-pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:1130-4.
33. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000;119:854-65.
34. Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, et al. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 2000;289(5482):1194-7.
35. Vogelstein B. Genetic testings for cancer: The surgeon's critical role. *Familial colon cancer*. *J Am Coll Surg* 1999;188:74–9.
36. Lynch HT, Lynch JF. The Lynch syndromes. *Curr Opin Oncol* 1993;5:687–96.
37. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23(1-2):11-27.
38. Bosserhoff AK, Grussendorf-Conen EI, Rübben A, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Buettner R, Merkelbach-Bruse S. Multiple colon carcinomas in a patient with Cowden syndrome. *Int J Mol Med*. 2006;18(4):643-7.

39. Yamagata S, Muto T, Uchida Y, Masaki T, Higuchi Y, Sawada T, Hirooka T. Polypoid growth and K-ras codon 12 mutation in colorectal cancer. *Cancer*. 1995;75(4):953-7.
40. Wang XW, Harris CC. TP53 tumour suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surv*. 1996;28:169-96.
41. Allen JJ. Molecular biology of colon polyps and colon cancer. *Semin Surg Oncol*. 1995;11(6):399-405.
42. Cruz-Bustillo Clarens D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:48-59.
43. Thomas Melanie B, Hoff Paulo M, Wolff Robert A, "Chapter 16. Colorectal Cancer" (Chapter). Kantarjian HM, Wolff RA, Koller CA: MD Anderson Manual of Medical Oncology: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=2790218>.
44. Fakih MG, Padmanabhan A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know. *Oncology (Williston Park)*. 2006;20(6):579-87.
45. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol*. 2003;16(4):376-88.
46. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 14(10): 2843-77.
47. Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001;19(6):1865-8.
48. Barault L, Veyrie N, Jooste V, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer*. 2008;122(10):2255-9.
49. Luna-Pérez P, Segura J, Alvarado I, Labastida S, Santiago-Payán H, Quintero A. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2000;7(10):727-31.
50. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res*. 1998;58(6):1149-58.
51. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol*. 2008;19(3):508-15.
52. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):374-9.
53. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006;66(8):3992-5.
54. Manne U, Weiss HL, Myers RB, Danner OK, Moron C, Srivastava S, Grizzle WE. Nuclear accumulation of p53 in colorectal adenocarcinoma: prognostic importance differs with race and location of the tumor. *Cancer*. 1998;83(12):2456-7.

55. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, et al. p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1997;3(10):1685-90.
56. Rebischung C, Gérard JP, Gayet J, Thomas G, Hamelin R, Laurent-Puig P. Prognostic value of P53 mutations in rectal carcinoma. *Int J Cancer*. 2002;100(2):131-5.
57. Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1994;331(4):213-21.
58. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(16):1196-206.
59. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000;342(2):69-77.
60. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(9):917-23.
61. Hemminki A, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*. 2000;119(4):921-8.
62. Mayer RJ. Harrison's Principles of Internal Medicine. Part 5: Oncology and Hematology; Gastrointestinal Tract Cancers, 523-33.
63. Herszényi L, Farinati F, Miheller P, Tulassay Z. Chemoprevention of colorectal cancer: feasibility in everyday practice? *Eur J Cancer Prev*. 2008;17(6):502-14.
64. Das D, Arber N, Jankowski JA. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion*. 2007;76(1):51-67.
65. Gill S, Sinicropo FA. Colorectal cancer prevention: is an ounce of prevention worth a pound of cure? *Semin Oncol*. 2005;32(1):24-34.
66. Arber N, Levin B. Chemoprevention of colorectal cancer: ready for routine use? *Curr Top Med Chem*. 2005;5(5):517-25.
67. American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer. http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED_2_3X_ACS_Cancer_Detection_Guidelines_36.asp (accessed Nov 1, 2008).
68. Hampton T. Cancer prevention efforts stalled. *JAMA*. 2008;299(19):2264.
69. Paulson EC, Mitra N, Sonnad S, Armstrong K, Wirtalla C, Kelz RR, Mahmoud NN. National Cancer Institute designation predicts improved outcomes in colorectal cancer surgery. *Ann Surg*. 2008;248(4):675-86.
70. Mano MS, Duhoux F. Colon cancer: update on adjuvant therapy. *Clin Colorectal Cancer*. 2008;7(3):178-83.
71. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2343-51.

72. Comella P, Casaretti R, Sandomenico C, Avallone A, Franco L. Capecitabine, alone and in combination, in the management of patients with colorectal cancer: a review of the evidence. *Drugs* 2008;68(7):949-61.
73. Klein B, Gottfried M. Targeted agents to improve treatment results in colon cancer: bevacizumab and cetuximab. *J BUON* 2007;12 Suppl 1:S127-36.
74. Kalofonos HP, Grivas PD. Monoclonal antibodies in the management of solid tumors. *Curr Top Med Chem* 2006;6(16):1687-705.
75. Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I, Lowy DR. Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto oncogene. *Science* 1987;238:1408-10.
76. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003;284(1):54-65.
77. Di Marco E, Pierce JH, Fleming TP, Kraus et al. Autocrine interaction between TGF- α and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1989;4:831-8.
78. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37:S9-15.
79. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8132-6.
80. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003;284:54-65.
81. Karamouzis MV, Badra FA, Papavassiliou AG. Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:851-6.
82. Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1992;7:1273-8.
83. Poller DN, Spendlove I, Baker C, et al. Production and characterization of a polyclonal antibody to the c-erbB-3 protein: examination of c-erbB-3 protein expression in adenocarcinomas. *J Pathol* 1992;168:275-80.
84. Tanner B, Hasenclever D, Stern K, et al. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4317-23.
85. Badra FA, Karamouzis MV, Ravazoula, et al. Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications and epidermal growth factor receptor (EGFR) family expression. *Cancer Lett* 2006;244:34-41.
86. Lee JC, Wang ST, Chow NH, Yang HB. Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer* 2002;38:1065-71.
87. Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, et al. Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2. *Hum Pathol* 1998;29:771-7.

88. Kapitanovic S, Radosevic S, Slade N, et al. Expression of erbB-3 protein in colorectal adenocarcinoma: correlation with poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:205-11.
89. Sergina NV, Rausch M, Wang D, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445:437-41.
90. Hellyer NJ, Cheng K, Koland JG. ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 1998;333 (Pt 3):757-63.
91. Engelman JA, Cantley LC. The role of the ErbB family members in non-small cell lung cancers sensitive to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2006;12:4372s-4376s.
92. Fujimoto N, Wislez M, Zhang J, et al. High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2005;65:11478-85.
93. Hirata A, Hosoi F, Miyagawa M, et al. HER2 overexpression increases sensitivity to gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, through inhibition of HER2/HER3 heterodimer formation in lung cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(10):4253-60.
94. Engelman JA, Jänne PA, Mermel C, et al. ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(10):3788-93.
95. Buck E, Eyzaguirre A, Haley JD, Gibson NW, Cagnoni P, Iwata KK. Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2051-9.
96. Paganini-Hill A. Estrogen replacement therapy and colorectal cancer risk in elderly women. *Dis Colon Rectum.* 1999;42(10):1300-5.
97. Nanda K, Bastian LA, Hasselblad V, Simel DL. Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 1999;93(5 Pt 2):880-8.
98. Picariello L, Fiorelli G, Martinetti V, et al. Growth response of colon cancer cell lines to selective estrogen receptor modulators. *Anticancer Res.* 2003;23(3B):2419-24.
99. Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med.* 1962;6:47-59.
100. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986;231(4742):1150-4.
101. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(12):5925-30.
102. Fiorelli G, Picariello L, Martinetti V, Tonelli F, Brandi ML. Functional estrogen receptor beta in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;261:521-7.
103. Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vondoros G et al. Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 2003;39:1251-8.
104. Singh S, Poulsom R, Hanby AM, et al. Expression of oestrogen receptor and oestrogen-inducible genes pS2 and ERD5 in large bowel mucosa and cancer. *J Pathol.* 1998;184(2):153-60.

105. Cho NL, Javid SH, Carothers AM, Redston M, Bertagnolli MM. Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/+ mice. *Cancer Res.* 2007;67(5):2366-72.
106. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247:75-8.
107. Cavallini A, Messa C, Pricci M, Caruso ML, Barone M, Di Leo A. Distribution of estrogen receptor subtypes, expression of their variant forms, and clinicopathological characteristics of human colorectal cancer. *Dig. Dis. Sci.* 2002;47:2720-8.
108. Peng B, Lu B, Leygue E, Murphy LC. Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J. Mol. Endocrinol.* 2003;30:13-29.
109. Nilsson S, Makela S, Treuter E et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 2001;81:1535-65.
110. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:1980-9.
111. Otto C, Fuchs I, Altmann H, et al. In vivo characterization of estrogen receptor modulators with reduced genomic versus nongenomic activity in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;111(1-2):95-100.
112. Acconcia F, Kumar R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett.* 2006;238:1-14.
113. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997;277:965-8.
114. Glaeser MT, Hanstein B, Beckmann MW, Niederacher D. Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas. *Horm. Metab. Res.* 2001;33:121-6.
115. Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, et al. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int. J. Cancer* 2000;89:217-23.
116. Wang Y, Wu MC, Sham JS, Zhang W, Wu WQ, Guan XY. Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer* 2002;95:2346-52.
117. Gnanapragasam VJ, Leung HY, Pulimood AS, Neal DE, Robson CN. Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2001;85:1928-36.
118. Torres-Arzuayus MI, Font de Mora J, Yuan J, et al. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell.* 2004;6(3):263-74.
119. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3:415-28.
120. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* 2004;18: 2315-35.

121. Louie MC, Revenko AS, Zou JX, Yao J, Chen HW. Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity. *Mol. Cell Biol.* 2006;26:3810-23.
122. Louie MC, Zou JX, Rabinovich A, Chen HW. ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol. Cell Biol.* 2004;24:5157-71.
123. Vadlamudi RK, Wang RA, Mazumdar A et al. Molecular cloning and characterization of PELP1, a novel human coregulator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 2001;276:38272-9.
124. Vadlamudi RK, Kumar R. Functional and biological properties of the nuclear receptor coregulator PELP1/MNAR. *Nucl. Recept. Signal.* 2007;5:e004.
125. Mishra SK, Balasenthil S, Nguyen D, Vadlamudi RK. Cloning and functional characterization of PELP1/MNAR promoter. *Gene* 2004;330:115-122.
126. Nair SS, Mishra SK, Yang Z, Balasenthil S, Kumar R, Vadlamudi RK. Potential role of a novel transcriptional coactivator PELP1 in histone H1 displacement in cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:6416-23.
127. Choi YB, Ko JK, Shin J. The transcriptional corepressor, PELP1, recruits HDAC2 and masks histones using two separate domains. *J. Biol. Chem.* 2004;279:50930-41.
128. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99:14783-8.
129. Nair S, Vadlamudi RK. Emerging significance of ER-coregulator PELP1/MNAR in cancer. *Histol. Histopathol.* 2007;22:91-6.
130. Manavathi B, Nair SS, Wang RA, Kumar R, Vadlamudi RK. Proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein-1 is essential in growth factor regulation of signal transducers and activators of transcription 3 activation. *Cancer Res.* 2005;65:5571-7.
131. Balasenthil S, Vadlamudi RK. Functional interactions between the estrogen receptor coactivator PELP1/MNAR and retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 2003;278:22119-27.
132. Unni E, Sun S, Nan B et al. Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Res* 2004;64:7156-8.
133. Vadlamudi RK, Balasenthil S, Broaddus RR, Gustafsson JA, Kumar R. Deregulation of estrogen receptor coactivator proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein-1/modulator of nongenomic activity of estrogen receptor in human endometrial tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6130-8.
134. Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* 1996;15:3667-75.
135. Torchia J, Rose DW, Inostroza J, et al. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 1997;387:677-84.
136. Giannini R and Cavallini A. Expression analysis of a subset of coregulators and three nuclear receptors in human colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:4287-92.

137. Mukherjee A, Amato P, Allred DC, et al Steroid receptor coactivator 2 is essential for progesterone-dependent uterine function and mammary morphogenesis: insights from the mouse--implications for the human. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102:22-31.
138. Picard F, Gehin M, Annicotte J, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 2002;111:931-41.
139. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Carlberg C. The genes of the coactivator TIF2 and the corepressor SMRT are primary 1alpha,25(OH)2D3 targets. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:257-60.
140. Holt PR, Arber N, Halmos B, et al. Colonic epithelial cell proliferation decreases with increasing levels of serum 25-hydroxy vitamin D. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:113-9.
141. Duong BN, Elliott S, Frigo DE et al. AKT regulation of estrogen receptor beta transcriptional activity in breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:8373-81.
142. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2:416-22.
143. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G Watson R. *Biotechnology* 1993;11(9):1026-30.
144. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, present and future. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1997;45(3):327-43.
145. Montero C. The Antigen-Antibody reaction in immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2003;51:1-4.
146. Suurmeijer AJ, Boon ME. Notes on the application of microwaves for antigen retrieval in paraffin and plastic tissue sections. *Eur J Morphol* 1993;31:144-150.
147. Jassam N, Bell SM, Speirs V, Quirke P. Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with Dukes' staging. *Oncol Rep* 2005;14:17-21.
148. Witte D, Chirala M, Younes A, Li Y, Younes M. Estrogen receptor beta is expressed in human colorectal adenocarcinoma. *Hum Pathol* .2001;32:940-4.
149. Wong NA, Malcomson RD, Jodrell DI, Groome NP, Harrison DJ, Saunders PT. ERbeta isoform expression in colorectal carcinoma: an in vivo and in vitro study of clinicopathological and molecular correlates. *J Pathol* 2005;207:53-60.
150. Rajkumar T, Gooden CS, Lemoine NR, Gullick WJ, Goden CS. Expression of the c-erbB-3 protein in gastrointestinal tract tumours determined by monoclonal antibody RTJ1. *J Pathol* 1993;170:271-8.
151. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrri A, et al. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2006;6:46.
152. Koumakpayi IH, Diallo JS, Le Page C, et al. Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:2730-7.
153. Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:338-48.
154. Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:802-8.

155. Offterdinger M, Schofer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 2002;157:929-39.
156. Srinivasan R, Gillett CE, Barnes DM, Gullick WJ. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res* 2000;60:1483-7.
157. Ciardiello F, Kim N, Saeki T, et al. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 7792-6.
158. Cho NL, Redston M, Zauber Ag, et al. Aberrant Crypt Foci in the Adenoma Prevention with Celecoxib Trial. *Cancer Prevention Research* 2008;1:21-31.
159. Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 2001;61:632-40.
160. Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 2000;60:245-48.
161. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 2003;3;281-92.
162. Wada-Hiraike O, Warner M, Gustafsson, JA. New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium, *Biochem. Soc Trans* 2006;34:1114-6.
163. O'Neill PA, Davies MP, Shaaban AM et al. Wild-type oestrogen receptor beta (ERbeta1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers. *Br J Cancer* 2004;91:1694-702.
164. Balfe PJ, McCann AH, Welch HM, Kerin MJ. Estrogen receptor beta and breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004;30(10):1043-50.
165. Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, et al. Insulin, insulin-like growth factor-I, endogenous estradiol, and risk of colorectal cancer in postmenopausal women. *Cancer Res* 2008;68:329-37.
166. Narayan S, Rajakumar G, Prouix H, Singh, P. Estradiol is trophic for colon cancer in mice: effect on ornithine decarboxylase and c-myc messenger RNA. *Gastroenterology* 1992;103:1823-32.
167. Singh S, Paraskeva C, Gallimore PH, Sheppard MC, Langman MJ. Differential growth response to oestrogen of premalignant and malignant colonic cell lines. *Anticancer Res* 1994;14:1037-41.
168. Winter DC, Taylor C, C.O.S. G, Harvey BJ. Mitogenic effects of oestrogen mediated by a non-genomic receptor in human colon. *Br J Surg* 2000;87:1684-9.
169. Arai N, Strom A, Rafter JJ, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem. Biophys Res Commun* 2000;270:425-31.
170. Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* 1996;56:4516-21.
171. Hennessy BA, Harvey BJ, Healy V. 17beta-Estradiol rapidly stimulates c-fos expression via the MAPK pathway in T84 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005;229:39-47.
172. Oduwole OO, Isomaa VV, Nokelainen PA, Stenback F, Vihko PT. Downregulation of estrogen-metabolizing 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression correlates inversely with Ki67 proliferation marker in colon-cancer development. *Int J Cancer* 2002;97:1-6.

173. English MA, Kane KF, Cruickshank N, Langman MJ, Stewart PM, Hewison M. Loss of estrogen inactivation in colonic cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2080-5.
174. Guo JY, Li X, Browning Jr JD, et al. Dietary soy isoflavones and estrone protect ovariectomized ERalphaKO and wild-type mice from carcinogen-induced colon cancer. *J Nutr* 2004;134:179-82.
175. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer* 2002;101:403-8.
176. Greger JG, Guo Y, Henderson R, Ross JF, Cheskis BJ. Characterization of MNAR expression. *Steroids* 2006;71:317-22.
177. Rajhans R, Vadlamudi RK. Comprehensive analysis of recent biochemical and biologic findings regarding a newly discovered protein-PELP1/MNAR. *Clin Exp Metastasis* 2006;23:1-7.
178. Vadlamudi RK, Balasenthil S, Sahin AA, et al. Novel estrogen receptor coactivator PELP1/MNAR gene and ERbeta expression in salivary duct adenocarcinoma: potential therapeutic targets. *Hum Pathol* 2005;36:670-5.
179. Rayala SK, Mascarenhas J, Vadlamudi RK, Kumar R. Altered localization of a coactivator sensitizes breast cancer cells to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2006;5:230-7.
180. Hudelist G, Czerwenka K, Kubista E, Marton E, Pischinger K, Singer CF. Expression of sex steroid receptors and their co-factors in normal and malignant breast tissue: AIB1 is a carcinoma-specific co-activator. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78:193-204.
181. Balmer NN, Richer JK, Spoelstra NS, Torkko KC, Lyle PL, Singh M. Steroid receptor coactivator AIB1 in endometrial carcinoma, hyperplasia and normal endometrium: Correlation with clinicopathologic parameters and biomarkers. *Mod Pathol* 2006;19:1593-605.
182. Xie D, Sham JS, Zeng WF, et al. Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36:777-83.
183. Henke RT, Haddad BR, Kim SE, et al. Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:6134-42.
184. Avivar A, Garcia-Macias MC, Ascaso E, Herrera G, O'Connor JE, de Mora JF. Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium. *FEBS Lett*. 2006;580:5222-6.
185. Zhou G, Hashimoto Y, Kwak I, Tsai SY, Tsai M.J. Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol Cell Biol* 2003;23:7742-55.
186. List HJ, Lauritsen KJ, Reiter R, Powers C, Wellstein A, Riegel AT. Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:23763-8.
187. Zhou HJ, Yan J, Luo W, et al. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res* 2005;65:7976-83.
188. Kuang SQ, Liao L, Wang S, Medina D, O'Malley BW, Xu J. Mice lacking the amplified in breast cancer 1/steroid receptor coactivator-3 are resistant to chemical carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65:7993-8002.

189. Xu FP, Xie D, Wen JM, et al. SRC-3/AIB1 protein and gene amplification levels in human esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2007;245:69-74.
190. Zhang H, Stephens LC, Kumar R. Metastasis tumor antigen family proteins during breast cancer progression and metastasis in a reliable mouse model for human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1479-86.
191. Li LB, Louie MC, Chen HW, Zou JX. Proto-oncogene ACTR/AIB1 promotes cancer cell invasion by up-regulating specific matrix metalloproteinase expression. *Cancer Lett* 2008;261:64-73.
192. Kirkegaard T, McGlynn LM, Campbell FM, et al. Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor - positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:1405-11.
193. Luo JH, Xie D, Liu MZ, et al. Protein expression and amplification of AIB1 in human urothelial carcinoma of the bladder and overexpression of AIB1 is a new independent prognostic marker of patient survival. *Int J Cancer* 2008;122:2554-61.
194. Coste A, Antal MC, Chan S, et al. Absence of the steroid receptor coactivator-3 induces B-cell lymphoma. *Embo J* 2006;25:2453-64.
195. Chen SL, Wang SC, Hosking B, Muscat GE. Subcellular localization of the steroid receptor coactivators (SRCs) and MEF2 in muscle and rhabdomyosarcoma cells. *Mol Endocrinol* 2001;15:783-96.
196. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H. Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:512-8.
197. Planas-Silva MD, Shang Y, Donaher JL, Brown M, Weinberg RA. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res* 2001;61(10):3858-62.
198. Yan J, Tsai SY, Tsai MJ. SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:387-94.
199. Yan J, Yu CT, Ozen M, Ittmann M, Tsai SY, Tsai MJ. Steroid receptor coactivator-3 and activator protein-1 coordinately regulate the transcription of components of the insulin-like growth factor/AKT signaling pathway. *Cancer Res* 2006;66:11039-46.
200. Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res* 2001;61(3):903-7.
201. Atanaskova N, Keshamouni VG, Krueger JS, Schwartz JA, Miller F, Reddy KB. MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene* 2002;21(25):4000-8.
202. Font de Mora J, Brown M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2000;20(14):5041-7.
203. Wu RC, Qin J, Yi P, et al. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell* 2004;15(6):937-49.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Grivas PD, Antonacopoulou A, Tzelepi V, Sotiropoulou-Bonikou G, Kefalopoulou Z, Papavassiliou AG, Kalofonos H. HER-3 in colorectal tumourigenesis: from mRNA levels through protein status to clinicopathologic relationships. Eur J Cancer. 2007;43(17):2602-11.
2. Grivas P, Tzelepi V, Sotiropoulou-Bonikou G, Kefalopoulou Z, Papavassiliou AG, Kalofonos H. Expression of ER β and its coregulator PELP1/MNAR in colorectal cancer: prognostic significance and clinicopathologic correlations. Cellular Oncology, In Press.