



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Κουκούλης

Διδακτορική Διατριβή

«Μελέτη προγνωστικών και προβλεπτικών παραγόντων καρκίνων ωοθηκών, τραχήλου μήτρας, ενδομητρίου. Διερεύνηση των συστημάτων NFκB/NFκB targeted genes και νευροπεπτιδίων (bombesin, ET-1) - πεπτιδασών (NEP)»

Υπό

ΕΛΕΝΗ-ΙΣΙΔΩΡΑ Α.ΠΕΡΔΙΚΟΥΡΗ, MD, MSc

ΕΙΔΙΚΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

Επιμελήτρια Β' ΓΝ Βόλου «Αχιλλοπούλειο»

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

Απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

© 2020 ΠΕΡΔΙΚΟΥΡΗ ΕΛΕΝΗ-ΙΣΙΔΩΡΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (59<sup>η</sup>/16-12-15 Γ.Σ.ΕΣ)

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπων) Δρ. Γεώργιος Κουκούλης  
Καθηγητής Παθολογικής-Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής Δρ. Ιωάννης Μεσσήνης  
Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής Δρ. Χρήστος Παπανδρέου  
Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής Αριστοτελείου  
Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής Δρ. Νικόλαος Σακελλαρίδης  
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής Δρ. Λάζαρος Σακκάς  
Ομότιμος Καθηγητής Ρευματολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης  
Καθηγητής Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής Δρ. Κωνσταντίνος Νταφόπουλος  
Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στην Πανεπιστημιακή Ογκολογική Κλινική, στην Πανεπιστημιακή Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική και στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστώ θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές της τριμελούς επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής, Καθηγητές Δρ. Χρήστο Παπανδρέου και Δρ. Γεώργιο Κουκούλη καθώς και τον καθηγητή Δρ. Ιωάννη Μεσσήνη για την αμέριστη βοήθειά τους στην εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής. Ευγνώμων αισθάνομαι απέναντι στην επίκουρη καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Δρ. Ευανθία Κωστοπούλου για την καθοδήγηση και την συμπαράσταση στα πρώτα μου ερευνητικά βήματα.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και το ερευνητικό προσωπικό των τμημάτων που με βοήθησαν όλα αυτά τα χρόνια στη συλλογή και την επεξεργασία των υλικών και των δεδομένων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στη μητέρα μου Μαρία, για την αμέριστη στήριξη της και στον πατέρα μου Άγγελο που πίστεψε σε εμένα όσο κανείς.

Τέλος, ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά τον άνθρωπο με τον οποίο μεγάλωσα μαζί, με έχει στηρίξει είκοσι και πλέον χρόνια, τόσο εμένα όσο και την υπέροχη οικογένειά μας, παρά την ιδιαιτερότητα της δικιάς του δουλειάς, το σύζυγο μου.

Ελένη - Ισιδώρα Α.Περδικούρη

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### Προσωπικές πληροφορίες

Όνομα: Ελένη-Ισιδώρα

Επώνυμο: Περδικούρη

Όνομα πατρός: Άγγελος

Όνομα μητρός μου: Μαρία

Ημερομηνία γέννησης: 16-09-1980

Τόπος γέννησης: Πειραιάς

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος

Τέκνα: Δύο

Υπηκοότητα: Ελληνική

Διεύθυνση Κατοικίας: Αθηνάς 18 Τ.Κ. 38222

Βόλος

Τηλέφωνο: 2421107433 - 6937252920

Email: [eigrouse@yahoo.gr](mailto:eigrouse@yahoo.gr)

### Σπουδές - Πrouπηρεσία

Ιούνιος 1998: Απολυτήριο Λυκείου από το 4<sup>ο</sup> Λύκειο Καλλιθέας Αττικής (17-6-1998) με βαθμό **Α ρ ι σ τ α Ε ί κ ο σ ι ( 20 )**

Σεπτέμβριος 1998: Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης με Πανελλήνιες εξετάσεις

Σεπτέμβριος 1999: Μετεγγραφή στην Ιατρική σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (εγγραφή στο 2<sup>ο</sup> έτος)

Αύγουστος 2004: Πτυχίο Ιατρικής σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμός **Λίαν Καλώς** (8,4) (02-08-2004)

Νοέμβριος 2004 – Φεβρουάριος 2005: Τρίμηνη άσκηση στα τακτικά παθολογικά, χειρουργικά και καρδιολογικά εξωτερικά ιατρεία και στα αντίστοιχα ιατρεία επειγόντων περιστατικών του Γενικού Νοσοκομείου Πύργου «Ανδρέας Παπανδρέου»

Φεβρουάριος 2005 – Αύγουστος 2006: Ιατρός υπόχρηη υπηρεσίας Υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Γαστούνης της Υ. Πε. Δυτικής Ελλάδος (από Φεβρουάριο 2006 με παράταση παραμονής)

Φεβρουάριος 2007 – Σήμερα: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με Θέμα «Μελέτη Προγνωστικών και Προβλεπτικών παραγόντων καρκίνων ωοθηκών, τραχήλου μήτρας, ενδομητρίου. Διερεύνηση συστημάτων NFκB/NFκB targeted genes και νευροπεπτιδίων (ET-1) – πεπτιδασών (NEP)»

Νοέμβριος 2007 – Φεβρουάριος 2011: Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογίας στην Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Δ/ντης: Καθηγητής Ν.Ε Σταθάκης μέχρι τον Αύγουστο 2008 και στη συνέχεια Καθηγητής Γ.Ν Νταλέκος)

Απρίλιος 2010 – Φεβρουάριος 2011: Ειδικευόμενη Ιατρός στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Δ/ντρια: Καθηγήτρια Π.Θ. Ματσουκά)

Ιούνιος 2011 – Ιούνιος 2014: Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογικής Ογκολογίας στην Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Δ/ντης: Καθηγητής Χρ. Ν. Παπανδρέου)

Σεπτέμβριος 2013 – Οκτώβριος 2018: Απόκτηση ευρωπαϊκής πιστοποίησης στο γνωστικό αντικείμενο της Παθολογικής Ογκολογίας από European Society of Medical Oncology (ESMO) μετά από εξετάσεις (28-09-13 Amsterdam Netherlands)

Σεπτέμβριος 2014: Απόκτηση τίτλου ιατρικής ειδικότητας Παθολογικής Ογκολογίας

Ιανουάριος 2015 – Νοέμβριος 2015: Επιστημονικός συνεργάτης Ογκολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και Γενικής Κλινικής «Ιαώ Θεσσαλίας»

Δεκέμβριος 2015 – Μάιος 2019: Επικουρική Επιμελήτρια Β΄ Παθολογικής Ογκολογίας στην Πανεπιστημιακή Ογκολογική Κλινική του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης Παπαγεωργίου (Δ/ντης: Καθηγητής Χρ.Ν. Παπανδρέου)

Φεβρουάριος 2018-Ιανουάριος 2019: Μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στο πλαίσιο του αγγλόφωνου μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο: Medical Research Methodology της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Οκτώβριος 2018 - Σήμερα : Ανανέωση ευρωπαϊκής πιστοποίησης στο γνωστικό αντικείμενο της Παθολογικής Ογκολογίας από European Society of Medical Oncology (ESMO) μετά από εξετάσεις (20-10-18 Munich Germany)

Ιανουάριος 2019: Απόκτηση Master of Science in Medical Research Methodology Aristotle University of Thessaloniki

Μάιος 2019 - σήμερα: Επιμελήτρια Β΄ Παθολογικής Ογκολογίας στη Μονάδα Χημειοθεραπείας του Γενικού Νοσοκομείου Βόλου «Αχιλλοπούλειο»

### Τίτλοι

α. Απολυτήριο Λυκείου από το 4<sup>ο</sup> Λύκειο Καλλιθέας Αττικής (17-06-1998) με βαθμό **Άριστα Είκοσι ( 20 )**

β. Πτυχίο Ιατρικής σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό **Λίαν Καλώς** (8,4) (02-08-2004)

γ. Άδεια ασκήσεως Ιατρικού επαγγέλματος με αριθμ.πρωτ.Υ9241/ 4-8-2004 (Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Αθηνών-Πειραιώς)

δ. Πιστοποίηση μετά από e-learning για Good Clinical Practice (18-07-2013)

ε. Πιστοποίηση στο γνωστικό αντικείμενο της Παθολογικής Ογκολογίας από European Society of Medical Oncology (ESMO) μετά από εξετάσεις (28-09-13 Amsterdam Netherlands, CME-credits 50 ESMO-MORA points)

στ. Δίπλωμα από την Ελληνική Ακαδημία Ογκολογίας μετά από εξετάσεις με το πέρας του 3<sup>ου</sup> Κύκλου Σπουδών κατά την περίοδο 2012-2013 (23-05-2014)

ζ. Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογικής Ογκολογίας με αριθμ. πρωτ. 6330/29-09-2014 (Περιφέρεια Θεσσαλίας Γεν. Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας)

η. Πιστοποίηση μετά από εξετάσεις και απόκτηση του Advanced Trauma Life Support (ATLS) από το American College of Surgeons (6-7 Νοεμβρίου 2015) (19 AMA PRA category 1 credits)

θ. Πιστοποίηση στο γνωστικό αντικείμενο της Παθολογικής Ογκολογίας από European Society of Medical Oncology (ESMO) μετά από εξετάσεις (20<sup>th</sup> October, Munich 2018, Germany, CME-credits 50 ESMO – MORA points)

ι. Master of Science of Aristotle University of Thessaloniki in Medical Research Methodology

### **Ξένες Γλώσσες**

α. ΑΓΓΛΙΚΑ: - Certificate of Proficiency in English University of Cambridge  
- Advanced Certificate of Pitman University

β. ΓΑΛΛΙΚΑ: - Diplome d`etudes de la langue Francaise D.E.L.F 2<sup>ieme</sup> DEGRE  
- Certificat de la Langue Francaise

### **Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών**

- α. Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ)
- β. Ομάδα Νέων Ελλήνων Ογκολόγων (ΟΝΕΟ)
- γ. Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παθολογικής Ογκολογίας (European Society for Medical Oncology)
- δ. Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας (American Society of Clinical Oncology)
- ε. Ελληνική Εταιρεία Γηριατρικής Ογκολογίας
- στ. Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Μελανώματος
- ζ. Εταιρεία Ουρογεννητικής Ογκολογίας



## Επιστημονικό Έργο

### **α. Εργασίες εκπονημένες στο πλαίσιο προγράμματος σπουδών Ιατρικών Σχολών Δημοκριτείου Θράκης και Εθνικού και Καποδιστριακού Αθηνών**

1) «Αρχές Λειτουργίας και Διαφορές Διαγνωστικών Μεθόδων» Ιατρική Σχολή Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης Εργ. Ιατρικής Φυσικής Υπεύθυνος Καθ. Φ. Άννινος (Ιανουάριος 1999)

2) «Πειραματισμός σε ζώα – Εναλλακτικές Μέθοδοι» Ιατρική Σχολή Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης Εργ. Βιολογίας και Γενετικής Υπεύθυνος Καθ. Θ. Λιαλιάρης (Φεβρουάριος 1999)

3) «Απόπτωση και καρδιαγγειακά νοσήματα» Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Υπεύθυνη Καθ. Ρ. Αγγελοπούλου (Ιανουάριος 2000)

4) «Μεταβολές οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου με τη γήρανση» Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Εργ. Φυσιολογίας (Σεπτέμβριος 2000)

### **β. Δημοσιεύσεις άρθρων στο Διεθνή Ιατρικό Τύπο**

1) Gioulbasanis I, Pallis, Vlachostergios PJ, Xyrafas A, Giannousi Z, Perdikouri E.I, Makridou M, Kakalou D, Georgoulas V. The Glasgow Prognostic Score (GPS) predicts toxicity and efficacy in platinum-based treated patients with metastatic lung cancer. Lung Cancer 2012 Aug 77(2):383-8

2) Bruno Gagnon, Ioannis Gioulbasanis, Victor Cohen, Carmela Pepe, David I. Small, Lin Yang, Eleni Isidora Perdikouri, Goulnar Kasymjanova, David Morris, Neil MacDonald, Jason Scott Agulnik; Prognostication in non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr18098)

3) B Gagnon, J S Agulnik, I Gioulbasanis, G Kasymjanova, D Morris & N MacDonald, Montreal prognostic score: estimating survival of patients with non-small cell lung cancer using clinical biomarkers British Journal of Cancer 2013 (109) 2066–2071 (acknowledged)

4) Perdikouri E, Liaskos C, Papacharalampous K, Nasi D, Kostopoulou E, Koukoulis G, and Papandreou C, The Role of NFκB, HIF-1a and Neuropeptide

(ET-1) - Peptidase (CD10, NEP) Axis in Ovarian Cancer: An Immunochemistry Approach J Mol Biomark Diagn 2019, 10:3

5) Eleni Isidora A. Perdikouri, Kostoula Arvaniti, Dimitrios Lathyris, Fani Apostolidou Kiouti, Eleni Siskou, Anna Bettina Haidich and Christos Papandreou, Infections Due to Multidrug-Resistant Bacteria in Oncological Patients: Insights from a Five-Year Epidemiological and Clinical Analysis, Microorganisms 2019, 7, 277

6) Matthaïos Papadimitriou – Olivgeris, Angeliki M. Andrianaki, Markos Marangos, Nikolaos Sipsas, Eirini A. Apostolidi, Efstratios Maltezos, Periklis Panagopoulos, Dimitris Karapiperis, Kostoula Arvaniti, Eleni-Isidora Perdikouri, George Samonis, Diamantis P. Kofteridis Hospital-wide antifungal prescription in Greek hospitals: a multicenter repeated point-prevalence study, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2019 November, <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03713-w>

#### **γ. Ανακοινώσεις Επιστημονικών Εργασιών σε Διεθνή Ιατρικά Συνέδρια**

1) Athens International Symposium «Advances and Perspectives in Geriatric Oncology», Athens 17-18 February 2012, Makridou M, Perdikouri E.I, Bacavou Hr, Papadopoulos V, Vasiliou Chr, Vaiou M, Giannousi Z, Zafeiriou A, Kakalou D, Gioulbasanis I, Papandreou C N. Comparison of the predictive and prognostic value of Mini Nutritional Assessment (MNA) and Glasgow Prognostic Score (GPS) in elderly patients with metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer

2) Hatzidaki E, Kakalou D, Perdikouri I, Vasiliou Chr, Vaiou M, Nasi D, Vlachostergios P, Giannousi Z, Bacavou Hr, Papatsibas G, Papandreou CN, Gioulbasanis I. Interrelations and associations with clinical outcomes in patients with non-small cell lung cancer. Researchgate Conference Paper Feb 2012

3) Gioulbasanis I, Kakalou D, Vassiliou Chr, Tzanis St, Perdikouri EI, Makridou M, Nasi D, Kamposioras K, Bacavou Chr, Vlachostergios P, Vlychou M, Papandreou CN, Which nutritional tool is related with musculature and functional status in patients with cachexia-related tumors? Research gate Conference Paper Sep 2012

4) European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid 21-24 April 2018, A. Andrianaki, G.Samonis, M. Marangos, M. Papadimitriou Olivgeris, N. Sipsas, E. Apostolidi, E. Maltezos, P. Panagopoulos, D. Karapiperis, K. Arvaniti, E. Perdikouri, D. Kofteridis, A point-prevalence study of antifungal therapy in Greek hospitals

#### **δ. Ανακοινώσεις Επιστημονικών Εργασιών σε Ελληνικά Ιατρικά Συνέδρια**

1) 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσσαλονίκη, 01-04 Δεκεμβρίου 2005, Φωτακοπούλου Ο, Κοντζιάλης Θ, Τζίφας Σ, Περδικούρη Ε.Ι, Τασσόπουλος Δ. Άσθμα και Κληρονομικότητα, Πνεύμων Συμπληρωματικό Τεύχος σελ.30

2) 44<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 9-11 Ιουνίου 2006, Τασσόπουλος Δ, Παπαδόπουλος Ν, Σπίνος Π, Ροδόπουλος Κ, Μαυρόπουλος Ι, Περδικούρη Ε.Ι, Κοντζιάλης Θ. Μέτρηση του Δείκτη Επιπολασμού της Τερηδόνας σε παιδιά 6 ετών (Βιβλίο Περ. σελ 85)

3) 44<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 9-11 Ιουνίου 2006, Μαυρόπουλος Ι, Παπαδόπουλος Ν, Σπίνος Π, Περδικούρη Ε.Ι, Κοντζιάλης Θ, Μαντή Θ, Βασιλικού Α, Τασσόπουλος Δ. Εμβολιασμός των Αθίγγανων (Βιβλίο Περ. σελ 241)

4) 2<sup>ο</sup> Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 10-12 Απριλίου 2014, Βίδρα Ν, Σχοινά Ε, Περδικούρη Ε.Ι, Γκιουλμπασάνης Ι, Κοντογιάννη Μ. Εκτίμηση της Διαιτητικής Πρόσληψης Ασθενών με ανεγχείρητο μεταστατικό καρκίνο Πνεύμονα και Ανώτερου πεπτικού (Βιβλίο Περ. σελ56)

5) 2<sup>ο</sup> Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 10-12 Απριλίου 2014, Γκιουλμπασάνης Ι, Περδικούρη Ε.Ι, Κάκαλου Δ, Μακρίδου Μ, Παπασιμίπας Γ, Μπάκαβου Χ, Νάση Δ, Κουράκος Π, Παπανδρέου Χ. Εκτίμηση της Θρέψης και της Λειτουργικής Κατάστασης Ηλικιωμένων ασθενών με μεταστατικό καρκίνο (Βιβλίο Περ. σελ 89)

6) 3<sup>ο</sup> Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας, Ιωάννινα 21-23 Απριλίου 2016, Κολιού Π, Φούντζηλα Ε, Λέββα Σ, Ευθυμιάδης Κ, Πολυχρονίδου Γ, Αδαμίδης Α, Ζαραλή Ο, Ζαΐρη Ε, Περδικούρη Ε.Ι, Ράλλης Γρ, Διονυσόπουλος Δ, Τιμοθεάδου Ε, Επίπτωση της θρομβοεμβολικής νόσου σε ασθενείς με νεοπλασματική νόσο στην κλινική Παθολογίας Ογκολογίας ΑΠΘ για το έτος 2015 (Βιβλίο Περ. σελ 65)

7) 3<sup>ο</sup> Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας, Ιωάννινα 21-23 Απριλίου 2016, Κολιού Π, Φούντζηλα Ε, Λέββα Σ, Ευθυμιάδης Κ, Τσιβίκη Α, Κυράνου Μ, Πατσιαβούρα Δ, Μαλεζά Ι, Ρούμκου Σ, Πολυχρονίδου Γ, Αδαμίδης Α, Ζαραλή Ο, Ζαΐρη Ε, Περδικούρη Ε.Ι, Ράλλης Γρ, Διονυσόπουλος Δ, Τιμοθεάδου Ε, Η χρήση καθετήρων portacath σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους και οι επιπλοκές τους την τετραετία 2011-2015: Πρακτικές από την Παθολογική Ογκολογική Κλινική ΑΠΘ Γενικό Νοσοκομείο Παπαγεωργίου (Βιβλίο Περ. σελ 70)

8) 4<sup>ο</sup> Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 3-5 Μαΐου 2018, Σαριδάκη Ζ., Μακατσώρης Θ., Λύπας Γ., Σαλούστρος Ε., Τσουκαλάς Ν., Χριστοπούλου Α., Βούλγαρης Ε., Περδικούρη Ε.Ι, Μπομπολάκη Η., Σουγκλάκος Ι., Αθανασιάδης Η., Εμμανουηλίδης Χ., Καλόφωνος Χ., Καραμπεάζης Α., Κατοπώδη Ο., Μπάμιας Α., Μπούτης Α., Ντουβέλης Ε., Ντουφεξής Δ., Πανόπουλος Χ., Παπαδόπουλος Β., Παπακοτούλας Π., Gouedar C., Νασιούλας Γ., Τιμόλογος Γ., Βαρθαλίτης Ι., Μπουκοβίνας Ι. Στρατηγικές Διερεύνησης Συνδρόμου Lynch σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου (ΚΠΕ) στην Ελλάδα. Πρώτη Ανακοίνωση των αποτελεσμάτων του προγράμματος της ΕΟΠΕ (Βιβλίο Περ. σελ 34)

«Μελέτη προγνωστικών και προβλεπτικών παραγόντων καρκίνων ωοθηκών, τραχήλου μήτρας, ενδομητρίου. Διερεύνηση των συστημάτων NFκB/NFκB targeted genes και νευροπεπτιδίων (bombesin, ET-1) - πεπτιδασών (NEP)»

**ΕΛΕΝΗ - ΙΣΙΔΩΡΑ Α.ΠΕΡΔΙΚΟΥΡΗ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Δρ. Γεώργιος Κουκούλης Καθηγητής Παθολογικής - Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
2. Δρ. Ιωάννης Μεσσήνης Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Δρ. Χρήστος Παπανδρέου Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Οι κακοήθειες του γυναικολογικού συστήματος αποτελούν μια από τις κύριες αιτίες θανάτου από κακοήθεια του γυναικείου πληθυσμού. Δεδομένου ότι ο καρκίνος ωοθηκών αποτελεί ωστόσο την κύρια αιτία θανάτου από κακοήθειες του γυναικολογικού συστήματος, σε συνδυασμό με την πιο συχνή αντιμετώπιση ασθενών με καρκίνο ωοθηκών στο κέντρο όπου πραγματοποιήθηκε η μελέτη, θεωρήθηκε σημαντική στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής, η ανεύρεση νέων βιοδεικτών με προγνωστική ή/και προβλεπτική αξία στη χορηγούμενη θεραπεία του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών.

**Σκοπός:** Στόχος της διατριβής ήταν να αναλυθεί, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, η έκφραση παραγόντων μεταγραφής όπως NFκB και HIF-1a, καθώς επιπλέον η έκφραση μορίων του άξονα ενδοθελίνης (CD-10, ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R) σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και να συσχετιστεί η έκφραση αυτή με συνολική επιβίωση και απόκριση στη θεραπεία.

**Μέθοδοι:** Ενενήντα τέσσερα (94) δείγματα ιστών μονιμοποιημένων σε κύβους παραφίνης, από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών συμπεριελήφθησαν στην εργασία. Η τελική ανάλυση των δειγμάτων χώρισε τις ασθενείς σε δύο σκέλη τα οποία διχοτομήθηκαν σε θετικό και αρνητικό (διχότομη ανάλυση), σύμφωνα με την ιστοική έκφραση των μελετούμενων παραγόντων τόσο σε επίπεδο πυρηνικής έκφρασης όσο και σε επίπεδο κυτταροπλασματικής έκφρασης.

**Αποτελέσματα:** Ασθενείς που εμφάνιζαν υψηλή πυρηνική έκφραση NFκB, υψηλή πυρηνική έκφραση HIF-1a, χαμηλή έκφραση CD-10 και υψηλή έκφραση υποδοχέων κυρίως ET<sub>A</sub>R αλλά και ET<sub>B</sub>R είχαν χειρότερη συνολική επιβίωση. Επιπλέον, ασθενείς με ευαίσθητη νόσο στην πλατίνη, είχαν χαμηλή πυρηνική έκφραση NFκB, υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση HIF-1a, υψηλή έκφραση CD-10 και χαμηλή έκφραση ET<sub>A</sub>R. Η κυτταροπλασματική έκφραση του NFκB και η έκφραση ET<sub>A</sub>R συσχετίστηκαν με ασθένεια πρώιμου σταδίου, ενώ η υψηλή έκφραση CD-10 συσχετίστηκε με νόσο προχωρημένων σταδίων. Τέλος, ένας συνδυασμός συγκεκριμένων βιοδεικτών συσχετίστηκε με τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

**Συμπέρασμα:** Η μελέτη μας επιβεβαιώνει την προγνωστική αξία του CD10 στο καρκίνωμα των ωθηκών μέσω της σύνδεσης του με τον άξονα ενδοθελίνης, ενώ ο τελευταίος (άξονας ET), με τη μεσολάβηση κυρίως του ET<sub>A</sub>R, μπορεί επίσης να έχει κλινική και θεραπευτική επίδραση. Τέλος, η πυρηνική έκφραση γνωστών μεταγραφικών παραγόντων όπως οι HIF-1a και NFκB μπορεί να είναι προγνωστική, ενώ τα μόρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της εκτίμησης της κλινικής έκβασης και ενδεχομένως να προβλέψουν τυχούσα αντίσταση στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα.

## **Abstract**

**Introduction:** Gynecological malignancies are one of the leading causes of death from malignancies in the female population. However, ovarian cancer is the leading cause of death from gynecological malignancies, moreover patients with ovarian cancer were more frequently treated at the center where the study was performed. As a result, it was considered to be mandatory, in the era of personalized medicine, the development of new markers of prognostic or even predictive value to the administered chemotherapy for the treatment of epithelial ovarian cancer.

**Aim:** Our study was designed to analyse immunohistochemically the expression of transcription factors NFkB and HIF-1a, in addition to biomarkers of endothelin axis (CD-10, ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R) in patients with ovarian cancer and relate their expression with overall survival and response to therapy.

**Methods:** Ninety four samples from paraffin-embedded tissues from patients with ovarian cancer were included. The final analysis of the samples compared two cohort groups that were dichotomized to positive and negative according to histoscore (either nucleoscore or cytoscore) of each patient.

**Results:** Patients expressing high NFkB nuclear score, high HIF-1a nuclear score, low CD-10 score and high ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R scores had worse overall survival. Moreover, platinum sensitive patients expressed lower nuclear NFkB, higher cytoplasmic HIF-1a, higher CD-10 and lower ET<sub>A</sub>R expression. NFkB cytoplasmic score and ET<sub>A</sub>R score were correlated with disease of early stage, while CD-10 histoscore was associated with advanced stages. More importantly, a combination of specific biomarkers was correlated with OS of patients.

**Conclusion:** Our study confirms the prognostic value of CD10 in ovarian carcinoma through its association with endothelin axis, while the last one (ET axis), mediated mainly through ET<sub>A</sub>R, may also have clinical and therapeutical impact. Finally, the nuclear expression of known transcriptional factors such as HIF-1a and NFkB could be prognostic biomarkers to assess clinical outcome and possibly predict resistance to platinum-based chemotherapy.



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	x
ABSTRACT.....	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	xiii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xvi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	xvii
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
Εισαγωγή.....	1
Κεφάλαιο 1 Καρκίνος ωοθηκών.....	1
1.1 Επιδημιολογία.....	1
1.2 Παθογένεση - προδιαθεσικοί και προφυλακτικοί παράγοντες.....	4
1.3 Παθολογοανατομία.....	12
1.3.1 Υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα - High-grade serous carcinoma (HGSC).....	12
1.3.2 Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα –Clear cell carcinoma (CCC).....	18
1.3.3 Ενδομητριοειδές καρκίνωμα-Endometrioid carcinoma (EC).....	22
1.3.4 Βλεννώδες καρκίνωμα – Mucinous carcinoma (MC).....	25
1.3.5 Χαμηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα - Low-grade serous carcinoma (LGSC).....	29
1.4 Διάγνωση.....	32
1.4.1 Συμπτώματα και σημεία.....	32
1.4.2 Ορολογικοί καρκινικοί δείκτες.....	33
1.4.3 Απεικονιστικές μέθοδοι.....	33
1.4.4 Ιστολογική διάγνωση.....	35
1.4.5 Σταδιοποίηση και προγνωστικοί παράγοντες.....	35
1.5 Αντιμετώπιση -θεραπευτικό πλάνο.....	39
1.5.1 Χειρουργική αντιμετώπιση.....	39
1.5.1.1 Χειρουργική αντιμετώπιση χαμηλού σταδίου πρωτοπαθούς νόσου (early primary disease).....	39
1.5.1.2 Χειρουργική αντιμετώπιση πρωτοπαθούς τοπικά προχωρημένου καρκίνου των ωοθηκών (primary advanced ovarian cancer).....	40
1.5.1.3 Χειρουργική αντιμετώπιση υποτροπιάζοντος καρκίνου ωοθηκών και παρηγορητικό χειρουργείο.....	42
1.5.2 Χημειοθεραπεία.....	43
1.5.2.1 Επικουρική χημειοθεραπεία για χαμηλού σταδίου νόσου (early stage disease).....	43
1.5.2.2 Πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία για επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών σταδίου κατά FIGOII–IV.....	44
1.5.2.3 Στοχεύουσα θεραπεία.....	46
1.5.2.4 Αξιολόγηση της απάντησης στη χημειοθεραπεία.....	47
1.5.2.5 Χημειοθεραπεία σε υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών.....	48
1.6 Παρακολούθηση (follow-up).....	50
Κεφάλαιο 2 Το σύστημα NF-Kb/ NF-Kb targeted genes.....	52

2.1 Ο ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ κB (NF-κB)(Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells).....	52
2.2 Οι πρωτεΐνες -μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.....	53
2.3 Η γενική δομή της οικογένειας NF-κB στα θηλαστικά.....	54
2.4 Ανασταλτικές πρωτεΐνες IκB - Inhibitor of NF-κB.....	57
2.5 Ρύθμιση σηματοδοτικής οδού NFκB.....	59
2.6 Μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB.....	60
2.7 NFκB και καρκίνος ωθηκών.....	63
2.8 Η οδός NFκB-Ubiquitin-πρωτεασώματος.....	67
2.8.1 Δομή και λειτουργία UPS.....	67
2.8.2 Το πρωτεάσωμα.....	69
Κεφάλαιο 3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1a.....	72
3.1 Δομή και λειτουργία.....	72
3.2 Ρύθμιση σηματοδοτικής οδού HIF-1a.....	75
3.3 HIF1 και γονίδια – στόχοι.....	80
3.4 HIF-1a και καρκίνος ωθηκών.....	83
Κεφάλαιο 4 Ο άξονας NEP/Νευροπεπτιδίων.....	85
4.1 Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάσηNEP.....	85
4.2 Φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες της NEP.....	86
4.3 NEP και καρκίνος ωθηκών.....	88
4.4 Νευροπεπτίδια – Ενδοθηλίνη.....	89
4.4.1 Δομή και λειτουργία.....	89
4.4.2 Ενδοθηλίνη και ο ρόλος της στην ωθυλακιορρηξία και στη φυσιολογική λειτουργία των ωθηκών.....	90
4.4.3 Η κατανομή των ισομορφών της ECE-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα της ωθηκής και τα κύτταρα της στεροειδογένεσης.....	92
4.5 Ο άξονας ενδοθηλίνης και των υποδοχέων ETR A/B.....	94
4.6 Ενδοθηλίνη και καρκίνος των ωθηκών.....	97
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	101
Κεφάλαιο 5 Σκοπός της μελέτης.....	101
Κεφάλαιο 6 Ασθενείς και μέθοδοι.....	103
6.1 Χαρακτηριστικά μελέτης.....	103
6.2 Ασθενείς.....	103
6.3 Μέθοδοι.....	107
Κεφάλαιο 7 Στατιστική ανάλυση.....	109
Κεφάλαιο 8 Ηθική και δεοντολογία.....	110
Κεφάλαιο 9 Αποτελέσματα.....	110
9.1 Περιγραφική Στατιστική.....	110
9.2 Histoscore και συσχετίσεις.....	112
9.3 Συσχέτιση συνολικής επιβίωσης (OS) με histoscore του κάθε βιοδείκτη.....	113
9.4 Έκφραση βιοδεικτών και συσχέτισή τους με ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα.....	118
9.5 Συσχέτιση μεταξύ histoscore και σταδίου του νοσήματος.....	119
9.6 Συσχέτιση μεταξύ histoscore και ιστολογικού υποτύπου επιθηλιακού καρκίνου ωθηκών.....	120
9.7 Συσχέτιση μεταξύ διαστήματος ελεύθερο νόσου (DFS) και histoscore.....	121
9.8 Πολυπαραγοντική ανάλυση.....	122
9.9 Αλληλεπιδράσεις έκφρασης βιοδεικτών με επιβίωση.....	123
Κεφάλαιο 10 Συζήτηση.....	124
10.1 Ευρύματα και κριτικός σχολιασμός βιβλιογραφίας.....	124
Κεφάλαιο 11 Συμπεράσματα.....	129
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	131
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	159

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.	Μοριακές ανωμαλίες σε υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα.....	17
Πίνακας 2.	Μοριακές ανωμαλίες σε διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα.....	20
Πίνακας 3.	Μοριακές ανωμαλίες σε ενδομητριοειδές καρκίνωμα.....	24
Πίνακας 4.	Μοριακές ανωμαλίες σε βλεννώδες καρκίνωμα.....	28
Πίνακας 5.	Μοριακές ανωμαλίες σε χαμηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα.....	30
Πίνακας 6.	Διαγνωστικές μέθοδοι καρκίνου ωοθηκών.....	35
Πίνακας 7.	Σταδιοποίηση καρκίνου ωοθηκών.....	36
Πίνακας 8.	Πρωτεΐνες μέλη οικογένειας NFκB.....	53
Πίνακας 9.	Κλινικά και δημογραφικά στοιχεία ασθενών.....	106
Πίνακας 10.	Αντισώματα.....	108
Πίνακας 11.	Histoscore με διαφορετικά cut off.....	110
Πίνακας 12.	Τελικά Histoscoreβάσει μέσων τιμών.....	112
Πίνακας 13.	Histoscore και συσχέτιση με απάντηση σε χημειοθεραπεία.....	119
Πίνακας 14.	Histoscore και συσχέτιση με ιστολογικό τύπο.....	121
Πίνακας 15.	Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση.....	123
Πίνακας 16.	Βιοδείκτες και επιβίωση.....	124

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.	Παράγοντες κινδύνου.....	5
Εικόνα 2.	Υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα.....	14
Εικόνα 3.	Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα.....	19
Εικόνα 4.	Ενδομητριοειδές καρκίνωμα.....	23
Εικόνα 5.	Βλεννώδες καρκίνωμα.....	26
Εικόνα 6.	Χαμηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα.....	30
Εικόνα 7.	Δομή NFκB.....	53
Εικόνα 8.	Διμερή NFκB.....	54
Εικόνα 9.	Rel homology domain .....	55
Εικόνα 10.	Πρωτεΐνες p50 p52.....	56
Εικόνα 11.	Δομή συμπλόκου p65/p50.....	57
Εικόνα 12.	Μέλη της οικογένειας IκB.....	58
Εικόνα 13.	Δομή του συμπλόκου NfκB με IκB αναστολέα.....	58
Εικόνα 14.	Σύμπλοκο IKK.....	59
Εικόνα 15.	Μονοπάτι ενεργοποίησης NFκB.....	60
Εικόνα 16.	Κανονικό, εναλλακτικό και άτυπο μονοπάτι.....	60
Εικόνα 17.	Εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης.....	63
Εικόνα 18.	Μόριο ουμπικουιλίνης.....	67
Εικόνα 19.	Μονοπάτι πρωτεόλυσης εξαρτώμενο από ουμπικουιλίνη.....	68
Εικόνα 20.	Πρωτεάσωμα.....	69
Εικόνα 21.	Δομή 20S πρωτεασώματος.....	70
Εικόνα 22.	Δομή 26S πρωτεασώματος.....	71
Εικόνα 23.	Τομή 26S πρωτεασώματος.....	71
Εικόνα 24.	Δομή και λειτουργία HIF.....	73
Εικόνα 25.	Δομή υπομονάδων HIF1a HIF2a.....	75
Εικόνα 26.	Συνθήκες υποξίας και δράση υδροξυλασών.....	76
Εικόνα 27.	Αρνητική ρύθμιση από FIH1 σε HIF1a.....	77
Εικόνα 28.	Ρύθμιση σύνθεσης HIF1a.....	78
Εικόνα 29.	Ενεργοποιημένα μονοπάτια.....	79
Εικόνα 30.	Μονοπάτι HIF1a.....	81
Εικόνα 31.	Γονίδια στόχοι του HIF1a και οι λειτουργίες του.....	82
Εικόνα 32.	HIF-1a σε συνθήκες υποξίας.....	84
Εικόνα 33.	Πίνακας σύγκρισης NEP και ECE-1.....	86
Εικόνα 34.	Δομή εξωκυττάριου τμήματος NEP.....	87
Εικόνα 35.	Μετατροπή προενδοθελίνης σε ενδοθελίνη 1.....	90
Εικόνα 36.	Παραγωγή ενδοθελινών στην ωοθήκη.....	93
Εικόνα 37.	Δομή διαμεμβρανικών υποδοχέων.....	94
Εικόνα 38.	Σηματοδοτικά μονοπάτια ενδοθελίνης στην ωοθήκη.....	95
Εικόνα 39.	Προτεινόμενο μοντέλο μονοπατιών ενεργοποίησης ET <sub>A</sub> R από ET1.....	97
Εικόνα 40.	Επιθηλιακά μονοπάτια μεσεγγυματικής μετατροπής.....	100
Εικόνα 41.	Πυρηνική έκφραση NFκB και συσχέτιση με συνολική επιβίωση (OS).....	114
Εικόνα 42.	Πυρηνική έκφραση HIF1a και συσχέτιση με συνολική επιβίωση (OS).....	115
Εικόνα 43.	Έκφραση CD10 και συσχέτιση με συνολική επιβίωση (OS).....	116
Εικόνα 44.	Έκφραση ET <sub>A</sub> R και συσχέτιση με συνολική επιβίωση (OS).....	117
Εικόνα 45.	Έκφραση ET <sub>B</sub> R και συσχέτιση με συνολική επιβίωση (OS).....	118
Εικόνα 46.	Έκφραση CD10 και συσχέτιση με διάστημα εκτός νόσου (DFS).....	122

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

BRCA 1/2	Breast Cancer gene
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
FANCD1	Fanconi Anemia subtype D1 kindreds
HGSC	High Grade Serous Carcinoma
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
TCGA	Cancer Genome Atlas
pRB	Retinoblastoma
FoxM1	Forkhead box protein M1
SCNA	Somatic Copy Number Alterations
STIC	Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma
CCC	Clear Cell Carcinoma
ER	Estrogen Receptor
WT-1	Wilms Tumor protein
HIF1a	Hypoxia Inducible factor 1a
HNB-1b	Hepatocyte Nuclear Factor 1b
ARID1A/BAF250a	AT rich interactive domain containing protein 1A
PPP2R1A	Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Alpha
MMR	Mismatch repair
PI3K	Phosphatidyloinositol 3-kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
ERK	Extracellular signal Reduced kinase
EC	Endometrioid carcinoma
PR	Progesterone receptor
PAX-8	Paired box gene 8
MSI	Microsatellite instability
MC	Mucinous carcinoma
HER 2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
LGSC	Low grade serous carcinoma
BRAF	v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase pathway
ERK	Extracellular signal Reduced Kinase
CT	Computed Tomography
MRI	Magnetic Resonance Imaging
PET	Positron Emission Tomography
PFS	Progression Free Survival
DFS	Disease Free Survival
OS	Overall Survival
FIGO	Federation of Gynecology and Obstetrics
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
GOG	GynaecologicalOncologyGroup
GCIG	GynaecologicCancerInterGroup
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
NFkB	Nuclera Factor kappa-light chain Enhancer of activated B cells
TNF-a	Tumor Necrosis Factor
NIK	NFkB inducing kinase
EOC	Epithelial Ovarian Cancer
siRNA	Short interfering RNA
PHDs	Prolyl Hydroxylase Domain Proteins
ODDD	Oxygen dependent degradation domain
VHL	Von Hippel Lindau
FIH	Factor Inhibiting HIF1
NEP/CD10	Neutral EndoPeptidase
ETA/BR	Endothelin A/B Receptor
COX1/2	CYCLOOXYGENASE
AUC	Area Under the Curve



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### *Εισαγωγή*

Παρά τον αρχικό σχεδιασμό για την εκπόνηση αυτής της μελέτης, ο ρυθμός ένταξης νέων ασθενών με διάγνωση ca τραχήλου μήτρας και ενδομητρίου δεν επέτρεπε την έγκαιρη ένταξη επαρκούς αριθμού ασθενών, προκειμένου να εξάγουμε έγκαιρα και όσο το δυνατό πιο αξιόπιστα στατιστικά αποτελέσματα και κατ'επέκταση αξιόπιστα συμπεράσματα. Βάσει των δεδομένων της Γυναικολογικής/Μαιευτικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπου και αντιμετωπίστηκαν και διαγνώστηκαν οι ασθενείς αρχικά, του Παθολογο-Ανατομικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του αρχείου της Πανεπιστημιακής Ογκολογικής Κλινικής, επιλέξαμε να μελετήσουμε τη δράση των μονοπατιών NF-kB/NF-kB targeted genes, ενδοθηλίνης-νευροπεπτιδασών σε συνδυασμό, με το μονοπάτι του HIF-1a (μεταγραφικού παράγοντα, NFkB targeted gene, ο οποίος ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας) στον επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, καθώς για αυτό το νόσημα είχαμε το μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με αντίστοιχο βιοπτικό υλικό προς ανοσοϊστοχημική μελέτη, σε συνδυασμό με πλήρη κλινική πληροφορία.

### *Κεφάλαιο 1: Καρκίνος ωοθηκών*

#### *1.1 Επιδημιολογία*

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή γυναικολογική κακοήθεια. Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί το πιο συχνό ιστολογικό τύπο (95%) με τον ορώδη να είναι ο πιο συχνός υπότυπος (75%). Ο πρωτοπαθής όγκος των σαλπίγγων και το πρωτοπαθές ορώδες καρκίνωμα του περιτοναίου θεωρούνται σπάνιες κακοήθειες. Ωστόσο μπορεί το ποσοστό του καρκίνου των σαλπίγγων να υποεκτιμάται δεδομένου ότι υποθέτουμε την εξόρμηση τόσο του καρκίνου ωοθηκών όσο και του περιτοναίου από το σαλπιγγικό ιστό. Οι ανωτέρω κακοήθειες (επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών, το καρκίνωμα των σαλπίγγων και το πρωτοπαθές καρκίνωμα του περιτοναίου) θεωρούνται ενιαίες νοσολογικές οντότητες.

Το 2008 περίπου 225.000 γυναίκες διαγνώσθηκαν παγκοσμίως με καρκίνο των ωοθηκών και 140.000 πέθαναν από τη νόσο (1). Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή γυναικολογική κακοήθεια στις αναπτυσσόμενες χώρες με επίπτωση 9.4 ανά 100.000 γυναίκες και θνησιμότητα 5.1 σε 100.000. Στις αναπτυσσόμενες χώρες αποτελεί την τρίτη πιο συχνή γυναικολογική κακοήθεια (ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι πιο συχνός) με επίπτωση 5.0 ανά 100.000 και θνησιμότητα 3.1 ανά 100.000. Ωστόσο ο καρκίνος ωοθηκών, αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου από γυναικολογικό καρκίνο, και την πέμπτη κατά σειρά αιτία θανάτου οφειλόμενη σε κακοήθεια ανάμεσα στο γυναικείο πληθυσμό (2). Συγκεκριμένα και βάσει των τελευταίων δεδομένων από το National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Results Program (SEER Database), αναμένονται 22.530 νέα περιστατικά να διαγνωσθούν το 2019, δηλαδή το 1,3% των συνολικών νέων κακοηθειών για το 2019, ενώ σε ό,τι αφορά τους θανάτους υπολογίζεται πως 13.980 ασθενείς διαγνωσμένες με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών θα αποβιώσουν στο τρέχον έτος.

Η επίπτωση της νόσου είναι υψηλότερη σε γυναίκες της λευκής φυλής (13.4 ανά 100.000) από γυναίκες έναντι της μαύρης φυλής (9.8 ανά 100.000). Ο μέσος όρος της ηλικίας που γίνεται συνήθως η διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών είναι τα 63 έτη. Η επίπτωση ανά ηλικία είναι:

- α) <20 ετών – 0.2 έως 1.4 ανά 100.000
- β) 20 με 29 – 1.8 έως 2.2 per 100.000
- γ) 20 με 39 – 3.1 έως 5 ανά 100.000
- δ) 40 με 49 – 9.0 έως 15.2 ανά 100.000
- ε) 50 με 59 – 21.8 έως 28.3 ανά 100.000
- στ) 60 με 69 – 36.2 έως 41.5 ανά 100.000
- ζ) ≥70 – 47.6 έως 56.7 ανά 100.000

Ο κίνδυνος να αναπτύξει μια γυναίκα καρκίνο των ωοθηκών κατά τη διάρκεια της ζωής της 1.3 % (seer database) υπολογισμένο βάσει δεδομένων συλλεγμένων από το 2014-2016.

Η ηλικία διάγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών είναι μικρότερη σε γυναίκες με κληρονομούμενο γενετικό σύνδρομο. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών φθάνει το 20 με 30% ως την ηλικία των 35 σε γυναίκες με γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA1 και σε αυτές με μετάλλαξη στο BRCA2, ο κίνδυνος φθάνει σε αντίστοιχο ποσοστό ως την ηλικία των 50 ετών (3)(4). Η



συνήθης ηλικία διαγνώσεως του καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες με σύνδρομο Lynch είναι τα 43 με 50 έτη (5).

Η πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο: εντοπιζόμενο στην πρωτοπαθή εστία σε ποσοστό 15%, εξαπλούμενο σε περιοχικούς λεμφαδένες σε ποσοστό 17%, με απομακρυσμένες μεταστάσεις στο 61% των περιπτώσεων, ενώ χωρίς δυνατότητα σταδιοποίησης παρουσιάζεται το 7% των ασθενών.

Η πλειονότητα των πρωτοπαθών κακοήθων όγκων των ωοθηκών εξορμούνται από επιθηλιακά κύτταρα (95%), ενώ οι υπόλοιποι προέρχονται από άλλους τύπους κυττάρων των ωοθηκών (όγκοι από βλαστικά κύτταρα, στρωματικοί όγκοι της γεννητικής ταινίας).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τόσο το καρκίνωμα των σαλπίγγων όσο και το καρκίνωμα του περιτοναίου εντάσσονται στην ίδια νοσολογική οντότητα με τον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Σε ότι αφορά ειδικά επιδημιολογικά στοιχεία για αυτές τις οντότητες, το καρκίνωμα των σαλπίγγων αποτελεί το 0.2% των κακοηθειών του γυναικείου πληθυσμού στις ΗΠΑ. Η ετήσια επίπτωση από το 1998 έως 2003 ήταν 0.41 ανά 100.000 γυναίκες. Η μεγαλύτερη επίπτωση ήταν σε γυναίκες ηλικίας 70 με 79 (1.63 ανά 100.000). Η επίπτωση ήταν υψηλότερη σε γυναίκες της λευκής φυλής (0.41 ανά 100.000) σε σχέση με της μαύρης (0.27 ανά 100.000). Το στάδιο κατά τη διάγνωση του πρωτοπαθούς όγκου των σαλπίγγων διακυμαίνεται: εντοπισμένο (36%), με τοπική επέκταση (30%), με απομακρυσμένες μεταστάσεις (32%) (6).

Το καρκίνωμα του περιτοναίου, το οποίο συχνά αναφέρεται και ως ορώδες καρκίνωμα του περιτοναίου, εμφανίζει ετήσια επίπτωση του στις ΗΠΑ (με δεδομένα από το 1995 έως το 2004) περίπου σε 0,46 ανά 100.000 γυναίκες (5). Η υψηλότερη επίπτωση ήταν ανάμεσα σε γυναίκες ηλικίας 70 με 74 (0.27 ανά 100.000), καθώς και σε γυναίκες της λευκής φυλής (0.50 ανά 100.000) σε σχέση με της μαύρης (0.18 ανά 100.000) (7).

Το καρκίνωμα περιτοναίου χαρακτηρίζεται από την παρουσία «ενδοπεριτοναϊκής» νόσου οπότε όλα τα περιστατικά διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο. Παρά τις εξελίξεις στη χειρουργική και χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης των γυναικών με επιθηλιακή νεοπλασία ωοθηκών σταδίου III ή IV έχει παραμείνει σταθερό τα τελευταία 30 χρόνια, μόλις στο 12%.

## 1.2 Παθογένεση - προδιαθεσικοί και προφυλακτικοί παράγοντες

Ο μηχανισμός παθογένεσης που συσχετίζει παράγοντες κινδύνου και τον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, δεν είναι σαφής. Παραδοσιακά υπάρχουν δυο θεωρίες:

α) Αδιάκοπη ωορρηξία (incessant ovulation): Οι επανειλημμένες ωορρηξίες έχουν ως αποτέλεσμα μικροτραυματισμούς του επιθηλίου της ωοθήκης, οι οποίοι με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν στην κακοήθη εξαλλαγή του (7). Η θεωρία αυτή στηρίζεται στην παρατήρηση πως γυναίκες με καταστολή ωορρηξίας με από του στόματος αντισυλληπτικά, ή λόγω εγκυμοσύνης ή θηλασμού, έχουν μικρότερη επίπτωση εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών.

β) Έκθεση σε γοναδοτροφίνες: Η εμμένουσα έκθεση των ωοθηκών σε γοναδοτροφίνες (FSH, LH) και σε αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης μπορεί να οδηγεί στην καρκινογένεση. Το παραπάνω βασίζεται στην παρατήρηση πως όγκοι ωοθηκών τεχνητοί σε πειραματικό επίπεδο εκφράζουν υποδοχείς γοναδοτροφινών (8). Αντιθέτως, υπάρχουν αποδείξεις πως οι πολλαπλές κυήσεις συνδέονται με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών (9).

Οι παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη τόσο του καρκίνου των σαλπίγγων ή του πρωτοπαθούς καρκίνωματος του περιτοναίου είναι λιγότερο καλά μελετημένοι ωστόσο θεωρούνται ίδιοι με αυτούς του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών.

Risk factors for ovarian cancer	Relative risk	Lifetime probability (%) <sup>[1]</sup>
<b>General population</b>	1.0	1.3 <sup>[1]</sup>
<b>BRCA1 gene mutation</b>		35 to 46 <sup>[2,3]</sup>
<b>BRCA2 gene mutation</b>		13 to 23 <sup>[2,3]</sup>
<b>Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colon cancer)</b>		3 to 14 <sup>[4,5]</sup>
<b>Other gene mutations</b>		
<i>BRIP1</i>		5.8 <sup>[6]</sup>
<i>RAD51C</i>		5.2 <sup>[7]</sup>
<i>RAD51D</i>		12 <sup>[7]</sup>
<b>Family history of ovarian cancer (with negative testing for a familial ovarian cancer syndrome)</b>	Uncertain <sup>[8]</sup>	
<b>Infertility</b>	2.67 <sup>[9]</sup>	
<b>Endometriosis (increase in risk of clear cell, endometrioid, or low grade serous carcinomas)</b>	2.04 to 3.05 <sup>[10]</sup>	
<b>Cigarette smoking (increase in risk of mucinous carcinoma)</b>	2.1 <sup>[11]</sup>	
<b>Intrauterine device</b>	1.76 <sup>[12]</sup>	
<b>Past use of oral contraceptives</b>	0.73 <sup>[13]</sup>	
<b>Past breastfeeding (for &gt;12 months)</b>	0.72 <sup>[14]</sup>	
<b>Tubal ligation</b>	0.69 <sup>[15]</sup>	
<b>Previous pregnancy</b>	0.71 <sup>[16]</sup>	
References:		

### Εικόνα 1. Παράγοντες κινδύνου

Cancer Stat Facts: Ovarian Cancer. National Cancer

Institute. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>. Accessed February 11, 2019.

Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 2007; 25:1329.

Kauff ND, Mitra N, Robson ME, et al. Risk of ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation-negative hereditary breast cancer families. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1382.

Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH, et al. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol* 2009; 10:400.

Barrow E, Robinson L, Alduaij W, et al. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: A report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet* 2009; 75:141.

Ramus SJ, Song H, Dicks E, et al. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107.

Song H, Dicks E, Ramus SJ, et al. Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol* 2015; 33:2901.

Lee JS, John EM, McGuire V, et al. Breast and ovarian cancer in relatives of cancer patients, with and without BRCA mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:359.

Ness RB, Cramer DW, Goodman MT, et al. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: A pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2002; 155:217.

Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: A pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol* 2012; 13:385.

Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, et al. Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review. *Gynecol Oncol* 2006; 103:1122.

TwoRoger SS, Fairfield KM, Colditz GA, et al. Association of oral contraceptive use, other contraceptive methods, and infertility with ovarian cancer risk. *Am J Epidemiol* 2007; 166:894.

Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, et al. Ovarian cancer and oral contraceptives: Collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 2008; 371:303.

Ip S, Chung M, Raman G, et al. A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeed Med* 2009; 4 Suppl 1:S17.

Cibula D, Widschwendter M, Májek O, Dusek L. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: Review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011; 17:55.

Tsilidis KK, Allen NE, Key TJ. Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer* 2011;105:1436.

Τα περισσότερα δεδομένα που αφορούν τον προσδιορισμό παραγόντων κινδύνου, έχουν συλλεχθεί από δυο μεγάλες προοπτικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες και αφορούσαν την παρακολούθηση 200.000 γυναικών με εμφάνιση 924 περιστατικών καρκίνου ωοθηκών (Nurses' Health Study), όσο και στην Ευρώπη (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) με παρακολούθηση 300.000 γυναικών με εμφάνιση 828 περιστατικών επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών (10).

α) Ηλικία – Η επίπτωση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών, του καρκίνου των σαλπίγγων και του καρκίνου του περιτοναίου αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας. Ανάλυση δεδομένων από τη NHS δείχνουν αύξηση του κινδύνου εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών κατά 2% για κάθε έτος σε γυναίκες < 50 ετών και αύξηση κατά 11% για γυναίκες > 50 ετών.

β) Αναπαραγωγικοί και ορμονικοί παράγοντες – Διάφοροι αναπαραγωγικοί παράγοντες σχετίζονται με τον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Ο κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών είναι πιο αυξημένος σε γυναίκες με διαταραχές γονιμότητας και είναι μειωμένος σε αυτές που λαμβάνουν από του στόματος αντισυλληπτικά ή είναι πολύτοκες.

γ) Πρόωρη εμμηναρχή ή καθυστερημένη εμμηνόπαυση – τόσο η πρόωρη εμμηναρχή (πριν την ηλικία των 12) όσο και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση (μετά την ηλικία των 52) έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών, καθώς βάσει της θεωρίας της αδιάκοπης ωορρηξίας, αυξάνεται ο

συνολικός αριθμός των κύκλων ωορρηξίας κατά τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας (και στις δύο μελέτες βρέθηκε αύξηση του κινδύνου 2-7% για κάθε επιπλέον χρόνο ωορρηξίας)

δ) Ατοκία και άλλοι μαιευτικοί παράγοντες – Γυναίκες που δεν έχουν ποτέ κυοφορήσει έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών, ενώ αντίθετα ιστορικό τελειόμηνης κύησης σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο. Αυτό φάνηκε και στη μελέτη της EPIC με ανάδειξη μείωσης του κινδύνου σε πολύτοκες σε σχέση με άτοκες γυναίκες (0,27 έναντι 0,3 RR 0,71, 95% CI 0,59-0,87). Σε γυναίκες με μια τουλάχιστον τελειόμηνη κύηση, ο κίνδυνος για επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών μειώνεται κατά 8% για κάθε επιπλέον κύηση. Η πολυτοκία σχετίζεται και με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των σαλπίγγων. Οι αυτόματες αποβολές ή αμβλώσεις (οι προκλητές) δε φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών (11).

ε) Υπογονιμότητα – Η υπογονιμότητα αποτελεί παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών, αν και η προκλητή ωοθυλακιορρηξία ως θεραπεία υπογονιμότητας δε μοιάζει να αυξάνει τον κίνδυνο.

στ) Ενδομητρίωση – Η ενδομητρίωση μοιάζει να συσχετίζεται με ορισμένους ιστολογικούς υπότυπους επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών (διαυγοκυτταρικό, ενδομητριοειδές και χαμηλού κακοήθους δυναμικού ορώδες) (12). Ο κίνδυνος μετατροπής σε κακοήθεια της ενδομητρίωσης υπολογίζεται σε 2,5% (13). Ο επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών που αναπτύσσεται σε έδαφος ενδομητρίωσης φαίνεται να αναπτύσσεται σε νεότερες γυναίκες και μοιάζει να έχει σε γενικές γραμμές καλύτερη πρόγνωση.

ζ) Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών – Γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών μοιάζουν να έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ωοθηκών (14).

η) Μετεμμηνοπαυσιακή ορμονοθεραπεία – Ο απόλυτος κίνδυνος ανάπτυξης επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών σε έδαφος λήψης μετεμμηνοπαυσιακής ορμονοθεραπείας φαίνεται μικρός, κυρίως όταν πρόκειται για συνδυασμένη ορμονοθεραπεία με οιστρογόνα-προγεστίνη (15).

θ) Ενδομητρική συσκευή αντισύλληψης – Δεδομένα από το NHS έδειξαν αύξηση του κινδύνου για καρκίνο ωοθηκών με χρήση ενδομητρικής συσκευής αντισύλληψης.

ι) Γενετικοί παράγοντες – Κληρονομούμενες μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA (BRCA1, BRCA2, MLH-1, MSH-2, PMS1, PMS2) θεωρούνται υπεύθυνες για το 10-15% των κρουσμάτων καρκίνου ωοθήκης (16).

ια) Κληρονομικό ιστορικό καρκίνου ωοθηκών – Ατομικό ή κληρονομικό ιστορικό καρκίνου μαστού είχε θεωρηθεί ως προδιαθεσικός παράγοντας ανάπτυξης καρκίνου ωοθηκών, ωστόσο οι γενετικές μεταλλάξεις στα BRCA genes είναι η αιτία του κινδύνου (17).

ιβ) Γενετικές μεταλλάξεις BRCA γονιδίων – Γυναίκες με γενετικές μεταλλάξεις BRCA γονιδίων έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ωοθηκών και μαστών. Ο εκτιμώμενος κίνδυνος σε όλη τη διάρκεια της ζωής είναι 35-46% για τις φορείς των μεταλλάξεων του BRCA1 και 13-23% για τις φορείς BRCA2 μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις BRCA είναι κυρίως υπεύθυνες για το μεγαλύτερο ποσοστό κληρονομούμενου καρκίνου των ωοθηκών. Οι γυναίκες φορείς των μεταλλάξεων BRCA1 αναπτύσσουν καρκίνο ωοθηκών σε μικρότερη ηλικία με μέσο όρο ηλικίας διάγνωσης τα 50 έτη και μια ετήσια επίπτωση της νόσου 2-3% σε ηλικία άνω των 40 ετών. Ο μέσος όρος ηλικίας διαγνώσεως στους φορείς των BRCA2 μεταλλάξεων είναι τα 60 έτη, παρόμοια με την ηλικία στο γενικό πληθυσμό, με μια αντίστοιχη ετήσια επίπτωση της νόσου 2-3% σε ηλικία άνω των 50 ετών. Το στάδιο κατά τη διάγνωση είναι το ίδιο τόσο για τις φορείς των μεταλλάξεων όσο και για το γενικό πληθυσμό, με το 70% των νοσούντων να διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο III ή IV. Ωστόσο σε ασθενείς με μεταλλάξεις συνήθως ο καρκίνος είναι πιο επιθετικός (υψηλότερου βαθμού κακοήθειας) σε σχέση με γυναίκες αντίστοιχης ηλικίας του γενικού πληθυσμού, ενώ σε ό,τι αφορά την ιστολογική ταξινόμηση, αυτή είναι παρόμοια τόσο στις γυναίκες φορείς των μεταλλάξεων BRCA 1 και 2 όσο και στο γενικό πληθυσμό. Οι φορείς των μεταλλάξεων ιδίως BRCA2 μοιάζουν να έχουν καλύτερη πρόγνωση από μη μεταλλαγμένες ασθενείς (18). Πιθανότατα αυτό οφείλεται σε μεγαλύτερη ευαισθησία της νόσου (σε έδαφος μεταλλάξεων) στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία με βάση πλατινούχο σκεύασμα σε σχέση με σποραδικά περιστατικά επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών (19). Μερικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η καλύτερη πρόγνωση για τις φορείς μεταλλάξεων BRCA είναι βραχείας διάρκειας. Η μέση παρακολούθηση στις μεταναλύσεις ήταν 3 χρόνια. Ωστόσο σε μελέτη καταγραφής όπου 281 γυναίκες φορείς μεταλλάξεων συγκρίνονταν με άλλες γυναίκες με

επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, αναφέρθηκε μεγαλύτερη επιβίωση στην ομάδα με BRCA μεταλλάξεις στα 3 χρόνια (3ετής επιβίωση 75% έναντι 65%) χωρίς όμως σημαντική διαφορά στην επιβίωση στα 5 ή περισσότερα χρόνια (20). Η μετάλλαξη του BRCA γονιδίου αποτελεί το πιο γνωστό παράγοντα κινδύνου και για ανάπτυξη καρκίνου σαλπίνγγων και περιτοναίου. Γι'αυτό γυναίκες φορείς της μετάλλαξης δικαιούνται προφυλακτικά χειρουργείο μείωσης του κινδύνου με μεωφοροσαλπινγγεκτομή. Ανασκόπηση 5 μελετών με 846 ασθενείς με BRCA μεταλλάξεις κατέληξε στο συμπέρασμα πως ο κίνδυνος για ανάπτυξη πρωτοπαθούς καρκίνου του περιτοναίου μετά από προφυλακτική αμφωσαλπινγο-ωοθηκεκτομή είναι 1,7% (0,5-10,7) (21). Ο κίνδυνος μοιάζει να είναι μεγαλύτερος σε BRCA1 μεταλλάξεις ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί και συσχέτιση με BRCA2 μεταλλάξεις.

ιγ) Lynch syndrome – το σύνδρομο Lynch (κληρονομούμενος μη σχετιζόμενος με πολύποδες καρκίνος παχέος εντέρου-hereditary non polyposis colorectal cancer HNPCC) σχετίζεται και με άλλες μορφές καρκίνου π.χενδομητρίου, ωοθηκών, ουροποιογενετικού, άλλων μορφών πρωτοπαθών γαστρεντερικού. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η πιο χαρακτηριστική νόσος του συνδρόμου Lynch, με τον καρκίνο ενδομητρίου να είναι η δεύτερη πιο συχνή κακοήθεια στις γυναίκες (εμφανίζεται σε ποσοστό 70%), ενώ ο καρκίνος ωοθηκών διαρκώς αυξάνεται σε συχνότητα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών κατά τη διάρκεια της ζωής είναι 3-14% σε σύγκριση με μόλις 1,5% στο γενικό πληθυσμό (20). Γυναίκες με σύνδρομο Lynch αποτελούν 1% των περιστατικών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών (22). Γυναίκες με σύνδρομο Lynch νοσούν σε μικρότερη ηλικία (43-50 έναντι 60 ετών στο γενικό πληθυσμό). Τόσο η ιστολογία όσο και η επιβίωση είναι παρόμοιες σε γυναίκες με Lynch σύνδρομο σε σύγκριση με σποραδικά κρούσματα καρκίνου ωοθηκών. Ο πιο συχνός ιστολογικός υπότυπος σε αυτές τις γυναίκες αφορά τον επιθηλιακό ορώδη-θηλώδη αν και έχουν εμφανιστεί και άλλοι υπότυποι όπως ενδομητριοειδές, βλεννώδες και διαυγοκυτταρικό (3). Δεδομένα από μελέτες δείχνουν πως γυναίκες με Lynch σύνδρομο εμφανίζονται πιο συχνά από το γενικό πληθυσμό με νόσο στάδιου I ή II, ωστόσο δε φαίνεται να υπάρχει διαφορά στα ποσοστά συνολικής 5ετούς επιβίωσης. Η αιτία αυτού του παράδοξου, δηλαδή της εμφάνισης μεν της νόσου σε μικρότερο στάδιο, χωρίς αυτό να μεταφράζεται σε διαφορά στη συνολική επιβίωση, παραμένει άγνωστη.

ιδ) Άλλοι γενετικοί παράγοντες – Ένα από τα γονίδια υπεύθυνα για την αναιμία Fanconi FANCD1 είναι όμοιο με το BRCA2. Δεδομένα υποστηρίζουν πως μεταλλάξεις και στα δυο αλληλία οδηγούν σε αναιμία Fanconi ενώ συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο ένα αλληλίο σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοηθειών σχετιζόμενων με BRCA1 μεταλλάξεις. Αυτό και άλλα γονίδια που σχετίζονται με την αναιμία Fanconi και το μονοπάτι BRCA διαδραματίζουν ρόλο στον ομόλογο ανασυνδυασμό (23). Δεδομένα υποστηρίζουν πως μεταλλάξεις γονιδίων σε αυτά τα μονοπάτια σχετίζονται τόσο με εμφάνιση καρκίνου του μαστού όσο και ωοθηκών (24).

ιε) Περιβαλλοντικοί παράγοντες

1) Κάπνισμα – Το κάπνισμα είτε ενεργό είτε στο παρελθόν αυξάνει τον κίνδυνο για βλεννώδη καρκίνο ωοθηκών (RR 2.1, 95% CI 1.7-2.7), όχι όμως για τους άλλους ιστολογικούς υπότυπους του επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών, ενώ ο κίνδυνος αυξάνει ανάλογα με τα επίπεδα καπνίσματος (packyears) (25).

2) Ταλκ και άσβεστος – Η σχέση ανάμεσα στη χρήση προϊόντων ταλκ στη γενετική περιοχή και στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών είναι αμφιλεγόμενη (26). Μια πιθανή εξήγηση για τη σχέση μεταξύ της χρήσης ταλκ και του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών είναι η χημική ομοιότητα της ταλκ με την άσβεστο, γνωστό καρκινογόνο, ενώ είναι γνωστό πως τις προηγούμενες δεκαετίες η πούδρα αναμειγνυόταν με άσβεστο.

ιστ) Άλλοι παράγοντες – Μερικά δεδομένα δείχνουν πως η επαγγελματική έκθεση στην μπιγιά και σε άλλα χημικά σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των σαλπίνγων (27).

ιζ) Διατροφή – Πολλές μελέτες προσπάθησαν να αποσαφηνίσουν το ρόλο της διατροφής σε σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών αλλά τα δεδομένα δε θεωρούνται αξιόπιστα. Χρειάζονται περισσότερα δεδομένα πριν γίνουν διατροφικές συστάσεις. Μια μεγάλη προοπτική μελέτη έχει δείξει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών σε γυναίκες με αυξημένη πρόσληψη λίπους ζωικής προέλευσης (28). Ωστόσο μετα-αναλύσεις δεν απέδειξαν συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων και καρκίνου ωοθηκών, αντίθετα η κατανάλωση σόγιας φάνηκε να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών (29)(30).



ιη) Φυσική δραστηριότητα – Δεν υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ φυσικής δραστηριότητας και κινδύνου για καρκίνο ωοθηκών. Ίσως υπάρχει μια μικρή μείωση του κινδύνου σε γυναίκες με μεγάλη φυσική (31).

ιθ) Παχυσαρκία – Υψηλός δείκτης μάζας σώματος φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Μάλιστα σε ανασκόπηση 28 μελετών φάνηκε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική συσχέτιση παχυσαρκίας ( $BMI > 30 \text{mg/m}^2$ ) και καρκίνου των ωοθηκών ( $OR\ 1.3, 95\% CI\ 1.1-1.5$ ) (32).

ii) Φλεγμονώδης νόσος πυέλου – Μελέτες δείχνουν συσχέτιση μεταξύ ιστορικού λοιμώξεων της πυέλου και καρκίνου των ωοθηκών (33).

ικ) Προστατευτικοί παράγοντες – Οι παράγοντες που συσχετίζονται λιγότερο με την πιθανότητα εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών είναι:

- 1) Χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών
- 2) Πολλαπλές κυήσεις
- 3) Σαλπινγο-ωοφορεκτομή
- 4) Απολίνωση σαλπίγγων
- 5) Υστερεκτομή
- 6) Θηλασμός

Συγκεκριμένα έχει φανεί πως η μακροχρόνια χορήγηση από του στόματος αντισυλληπτικών μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Ανάλυση 45 επιδημιολογικών μελετών από 21 χώρες έδειξε πως ακόμα και βραχυχρόνια χρήση αντισυλληπτικών σχετιζόταν με στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών (σχετικός κίνδυνος  $[RR] 0.73, 95\% CI\ 0.70-0.76$ ) (34). Ακόμα μεγαλύτερη μείωση του κινδύνου διαπιστώθηκε με αύξηση της διάρκειας χορήγησης των αντισυλληπτικών (μείωση του σχετικού κινδύνου κατά 20% για κάθε 5ετή λήψη αντισυλληπτικών ενώ στα 15 χρόνια έπεφτε ο κίνδυνος στο 50%). Το σημαντικότερο όλων ήταν η παραμονή της προστατευτικής δράσης 30 χρόνια μετά τη διακοπή της χρήσης των αντισυλληπτικών.

Παράλληλα, η αμφω σαλπινγο-ωοφορεκτομή μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, ωστόσο παρά την επέμβαση αυτή, υπάρχει ένα ποσοστό γυναικών που θα εμφανίσει δυνητικά πρωτοπαθές καρκίνωμα περιτοναίου. Η ωοφορεκτομή προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, πρέπει να περιλαμβάνει και την αφαίρεση των σαλπίγγων καθώς ελλοχεύει ο κίνδυνος πρωτοπαθούς καρκίνου των σαλπίγγων. Η αμφοτερόπλευρη

σαλπγγο-ωφορεκτομή σε προ εμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει ως αποτέλεσμα την πρόωρη εμμηνόπαυση με άμεσες επιπτώσεις στην υγεία της ασθενούς. Σε ότι αφορά την υστερεκτομή χωρίς ωφορεκτομή, μοιάζει η τελευταία από μόνη της να σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών (35). Γυναίκες με ιστορικό απολίνωσης των σαλπγγων παρουσίασαν μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν δεδομένα για τις εκάστοτε τεχνικές απολίνωσης που χρησιμοποιήθηκαν (RR 0.69, 95% CI 0.64-0.75) (36). Τέλος, σε ότι αφορά το θηλασμό, μια μετα-ανάλυση έξι μελετών δείχνει πως ο θηλασμός για συνολικό διάστημα >12 μηνών σε σύγκριση με απουσία του (never breast feeding) σχετίζεται με στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών (OR 0.72, 95% CI 0.54-0.97) (37).

### 1.3 Παθολογοανατομία

Η ιστοπαθολογική ταξινόμηση των επιθηλιακών καρκινωμάτων επιφανείας των ωοθηκών (τα οποία θα αναφέρουμε στο εξής με τον όρο καρκίνωμα των ωοθηκών) έχει τροποποιηθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων 10 ετών με τρόπο ώστε να διαφαίνονται καλύτερα τα γεγονότα σε μοριακό επίπεδο, τα οποία οδηγούν στην καρκινογένεση. Το καρκίνωμα των ωοθηκών δεν αντιμετωπίζεται πλέον ως μια ενιαία νοσολογική οντότητα αλλά ως πολλές διαφορετικές, με κάθε μια να έχει διαφορετικά μοριακά μονοπάτια ενεργοποιημένα κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης, με συνέπεια διαφορές τόσο σε ιστολογικό επίπεδο όσο και σε κλινικό. Τέτοιες διαφορές είναι η έκφραση διαφορετικών βιοδεικτών, η μεταστατικότητα της νόσου και η απαντητικότητα στη χημειοθεραπεία.

Υπάρχουν πέντε (5) υποκατηγορίες του καρκινώματος των ωοθηκών που είναι αρκετά ευδιάκριτες και καλά χαρακτηρισμένες (βάσει στοιχείων ιστοπαθολογίας, ανοσϊστοχημείας και μοριακών γενετικών αναλύσεων), τόσο ώστε να θεωρούνται ουσιαστικά διαφορετικές νοσολογικές οντότητες, υψηλής κακοήθειας ορώδες, διαυγοκυτταρικό, ενδομητριοειδές, βλενώδες και χαμηλής κακοήθειας ορώδες, σε σειρά από το πιο συχνά εμφανιζόμενο στο λιγότερο συχνά (38).

Η απλουστευμένη ταξινόμηση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών στον τύπο I και τον τύπο II που έχει επίσης προταθεί, αφενός δεικνύει το προηγούμενο σφάλμα να ομαδοποιεί μαζί ανεξάρτητους τύπους όγκων (π.χ.

βλεννώδες και διαυγοκυτταρικό), αφετέρου εμποδίζει κάθε πρόοδο στη χορήγηση στοχεύουσας σε κάθε υπότυπο θεραπείας και ως εκ τούτου θα ήταν καλό να αποφεύγεται (39).

Συγκεκριμένα, οι τύπου I όγκοι (χαμηλής κακοήθειας) (στους οποίους συμπεριλαμβάνονται ορώδεις χαμηλής κακοήθειας, ενδομητριοειδείς χαμηλής κακοήθειας, διαυγοκυτταρικοί και βλεννώδεις) συχνά φέρουν σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεϊνικές κινάσες και άλλα μόρια σηματοδότησης, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα δημιουργίας στοχευουσών θεραπειών, ενώ στους όγκους τύπου II (υψηλής κακοήθειας ορώδη) δεν υπάρχουν συχνές/επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα ογκογονίδια. Εντούτοις, παρά το ότι διαφορετικοί ιστολογικοί τύποι συγκαταλέγονται στην ίδια νοσολογική οντότητα, υπάρχουν μεταξύ τους σημαντικές. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα υψηλής κακοήθειας ορώδη καρκινώματα αποτελούν το 70% όλων των καρκινωμάτων των ωοθηκών και είναι υπεύθυνα για το 90% των θανάτων. Από τα παραπάνω είναι κατανοητό πως τα υψηλής κακοήθειας ορώδη είναι κυρίως υπεύθυνα για τη σημαντική νοσηρότητα και τη θνησιμότητα από επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Και ως εκ των ανωτέρω χρήζουν ιδιαίτερης μελέτης.

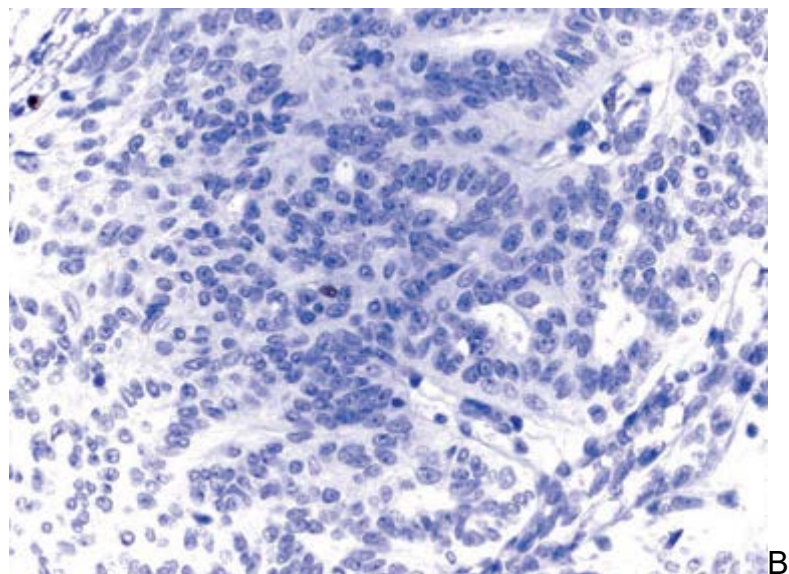
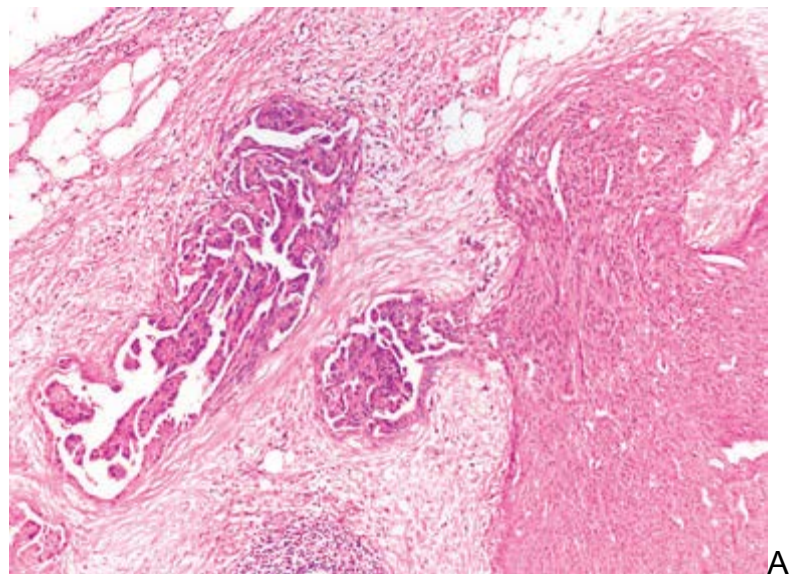
### 1.3.1 Υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα - *High-grade serous carcinoma (HGSC)*

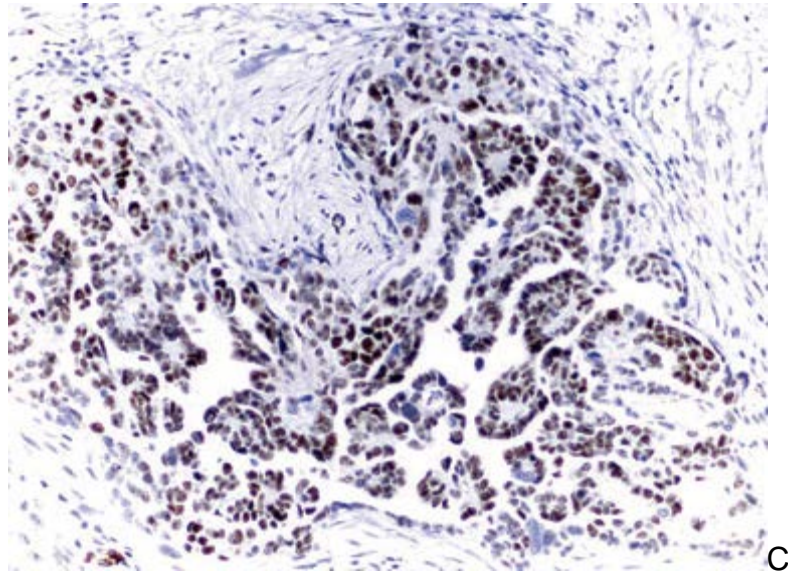
Το υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα (HGSC) είναι ο πιο συχνός υπότυπος και ταυτόχρονα ο πιο θανατηφόρος από όλους τους ιστολογικούς υπότυπους. Το HGSC αποτελεί το 70% με 80% των επιθηλιακών καρκίνων των ωοθηκών και είναι υπεύθυνο για το 90% των θανάτων (δεδομένα στατιστικά από βάσεις δεδομένων της Β. Αμερικής). Λιγότεροι από το 1% των HGSCs εντοπίζονται μόνο στην ωοθήκη κατά τη διάγνωση. Αντίστοιχα τα ποσοστά 5 ετούς επιβίωσης είναι 29% για ασθενείς σταδίου IIIc κατά τη διάγνωση και 13% για ασθενείς με στάδιο IV (40).

Σε ότι αφορά τη μακροσκοπική περιγραφή το μέγεθος των HGSC μπορεί να ποικίλλει από μικροσκοπικό μέχρι και διάμετρο όγκου πάνω από 20cm. Η εξωτερική επιφάνεια του νεοπλάσματος μπορεί να είναι λεία ή να φέρει μικροθλώδεις προσεκβολές. Η μάζα είναι συνήθως πολύχρωμη με κυστική υφή, ενώ συχνά συμπεριλαμβάνονται και τμήματα συμπαγή, με αιμορραγικά και

νεκρωτικά στοιχεία. Οι μεταστάσεις αφορούν το περιτόναιο και το επίπλου. Πρόκειται συνήθως για συρρέοντα οζίδια τα οποία θα δημιουργήσουν τελικά ενδεχομένως μεγάλες μάζες (omental cake).

Μέχρι πρόσφατα, πολλά HGSC θεωρήθηκαν λανθασμένα ως υψηλής κακοήθειας ενδομητριοειδή καρκινώματα ή μεικτά ορώδη και διαυγοκυτταρικά. Ωστόσο, διάφορες μοριακές τεχνικές καθώς και η ανοσοϊστοχημεία έδειξαν πως το μορφολογικό φάσμα του HGSC είναι ευρύτερο από ό,τι είχε ως τώρα θεωρηθεί και περιλαμβάνει συμπαγές, αδενωματώδεις, μεταβατικό όπως επίσης και θηλώδεις αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης (Εικόνα 2)(41).





**Εικόνα 2.** Όγκος με ενδομητριοειδές πρότυπο ανάπτυξης γεινιάζει με θηλώδεις περιοχές HGSC (A) p53 ανοσοϊστοχημεία αρνητική, παρουσία διήθησης από λεμφοκύτταρα (B) θετική πυρηνική WT-1 ανοσοϊστοχημεία σε τυπικό HGSC (C)

Σε ότι αφορά την ανοσοϊστοχημεία, τα HGSC εκφράζουν τυπικά ισχυρά και διάχυτα p53 (όπως θα δούμε και παρακάτω) και p16. Τα HGSC εκφράζουν επίσης WT-1, ER (υποδοχέα οιστρογόνου) και PAX-8 στις περισσότερες περιπτώσεις. Δεν εκφράζουν HNF-1b και καλρετινίνη. Αν και υπάρχουν στοιχεία υπέρ μοριακών διαφορών σε HGSC με διαφορετικές αρχιτεκτονικές ανάπτυξης, αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί και αυτή τη στιγμή δεν υπάρχουν υποκατηγορίες του με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τέλος, τόσο η πυρηνική ατυπία όσο και ο μιτωτικός δείκτης είναι υψηλά στο HGSC.

Μεταλλάξεις του TP53 είναι παρούσες σε ποσοστό από 50-80 % των HGSC. Το p53 ως γνωστό διαδραματίζει βασικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και στην επισκευή του DNA. Ενεργώντας στο G2 σημείο ελέγχου, το p53 μπορεί να διακόψει την κυτταρική ανάπτυξη και να επιδιορθώσει τη βλάβη του DNA πριν πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του. Εφόσον η βλάβη είναι μη επιδιορθώσιμη, το p53 οδηγεί το κύτταρο προς προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, απόπτωση. Επομένως, μεταλλάξεις του p53 έχουν ως συνέπεια τη μη διόρθωση και άρα τη μετάδοση της βλάβης του DNA οδηγώντας σε χρωμοσωμική αστάθεια. Η ανοσοϊστοχημεία για το p53 συσχετίζεται με μετάλλαξη missense (εστιακή μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε κωδικόνιο που αντιστοιχεί σε άλλο αμινοξύ- [www.genome.gov](http://www.genome.gov)) του γονιδίου TP53 (η πιο κοινή TP53 ανωμαλία), οπότε και

υπάρχει χαρακτηριστικά πυρηνική συσσώρευση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, ενώ η ανοσοϊστοχημεία για το p53 είναι έντονα και διάχυτα θετική. Οι non sense mutations (αλλαγή εστιακή στην αλληλουχία του DNA δίνει κωδικόνιο που οδηγεί σε διακοπή αντιγραφής ή σε mRNA που παράγει μη λειτουργική πρωτεΐνη- [www.genome.gov](http://www.genome.gov)), ενώ οι απαλοιφές οδηγούν στην πλήρη απουσία p53 πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα η ανοσοϊστοχημεία να είναι σε αντίθεση με το άθικτο πρότυπο του p53, οπότε και τα κακοήθη κύτταρα περιστασιακά εμφανίζουν πυρηνική χρώση για p53 (42).

Γαμετικές μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 ή BRCA2 είναι παρούσες σε περισσότερο από 15% των HGSC, ενώ οι σωματικές μεταλλάξεις των BRCA1/2 ή η μεθυλίωση εκκινήτων (promoters) άρα και η αποσιώπηση των γονιδίων BRCA1, είναι παρούσες σε ένα πρόσθετο 14%–22% των HGSCs(43). Και τα δύο γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA, η απώλεια των οποίων οδηγεί στην ελαττωματική επισκευή των διπλών σπασιμάτων της διπλής έλικας του DNA, μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination), γεγονός που οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια. Η απώλεια λειτουργίας των BRCA1/2 θεωρείται δυνητικά θανατηφόρα για τα κύτταρα, ωστόσο η παρουσία των μεταλλάξεων του p53 κάνει αυτά τα κύτταρα ικανά να επιβιώσουν. Ωστόσο, εκτός των γνωστών μεταλλάξεων των BRCA1/2, διαταραχές στον ομόλογο ανασυνδυασμό του DNA μπορούν να συμβούν σε HGSC ως αποτέλεσμα άλλων μηχανισμών όπως ενίσχυση της EMSY στο 8% των περιπτώσεων (πρωτεΐνη που συνδέεται με το BRCA2 στο exon 3 και έχει τη δυνατότητα να αποσιωπή τη δράση του BRCA2) (44), απώλεια του ογκοκατασταλτικού PTEN (7% των περιπτώσεων) (45), υπερμεθυλίωση του RAD51C (γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη που συμμετέχει στο μηχανισμό επιδιόρθωσης στο 2% των περιπτώσεων) ή άλλων σπάνιων μηχανισμών, έτσι ώστε συνολικά ο ομόλογος ανασυνδυασμός ως μέθοδος επιδιόρθωσης βλάβης του DNA να είναι ελαττωματικός στο 50% των HGSC.

Βάσει των δεδομένων του Cancer Genome Atlas (TCGA), σε περισσότερα από 400 HGSC, οι σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων είναι ασυνήθιστες σε HGSC, με εξαίρεση αυτές των TP53 και BRCA1/2. Η μελέτη TCGA προσδιόρισε επίσης τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζονται συνήθως στο HGSC (εκτός από αυτό του ομόλογου ανασυνδυασμού στον οποίο αναφερθήκαμε εκτενώς νωρίτερα) αυτά περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (pRB), το μονοπάτι PI3K/RAS,

NOTCH και FoxM1, κάνουντάς τα ταυτόχρονα υποψήφια για μοριακή στόχευση. Οι μοριακές ανωμαλίες σε HGSC συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

<b>High-grade serous carcinoma: μοριακά χαρακτηριστικά</b>
Χρωμοσωμική αστάθεια/ανευπλοειδία (100%)
p53 μεταλλάξεις (>90%), απώλεια BRCA (30%–45%)
Λίγες μεταλλάξεις, ποικίλες SCNA (Somatic copy number alterations)
Λάθη ομόλογου ανασυνδυασμού
FoxM1 (84% των περιπτώσεων), RB (67%), PI3K/RAS (45%) και
NOTCH (22%) διαταρχές σηματοδότησης
SCNA (Αλλαγές αριθμού σωματικών χρωμοσωμάτων)

**Πίνακας 1.** Μοριακές ανωμαλίες σε υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα

Παράλληλα, το 2001 περιγράφεται πλέον το ορώδες σαλπιγγικό ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα (Serous tubal intraepithelial carcinoma-STIC) στους κροσσούς των σαλπιγγικών σωλήνων. Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία/δυσπλασία των σαλπίγγων, ως διαγνωστική οντότητα, έχει μια μακροχρόνια και ασαφή ιστορία. Η ως τότε βιβλιογραφία (δηλαδή προ του 2001) είναι βασισμένη σε διαφορετικούς ορισμούς κατά περίπτωση και οι διάφορες μελέτες που είχαν διενεργηθεί παρέμεναν ανερμήνευτες (46). Τα τρέχοντα κριτήρια για το STIC περιλαμβάνουν την υψηλού βαθμού πυρηνική ατυπία, αντίστοιχη αυτής που αναγνωρίζεται σε HGSC. Από το 2001, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι όταν εξετάζονται λεπτομερώς τα παρασκευάσματα σαλπιγγικών σωλήνων, το STIC είναι η πιο συχή πρόδρομη βλάβη που απαντάται σε γυναίκες με γαμετικές μεταλλάξεις των BRCA1/2 που έχουν υποβληθεί σε προφυλακτική αμφω σαλπιγγο-ωοφορεκτομή καθώς επίσης και ότι η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία STIC

είναι παρούσα στο 50%–60% των γυναικών με σποραδικό επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών.

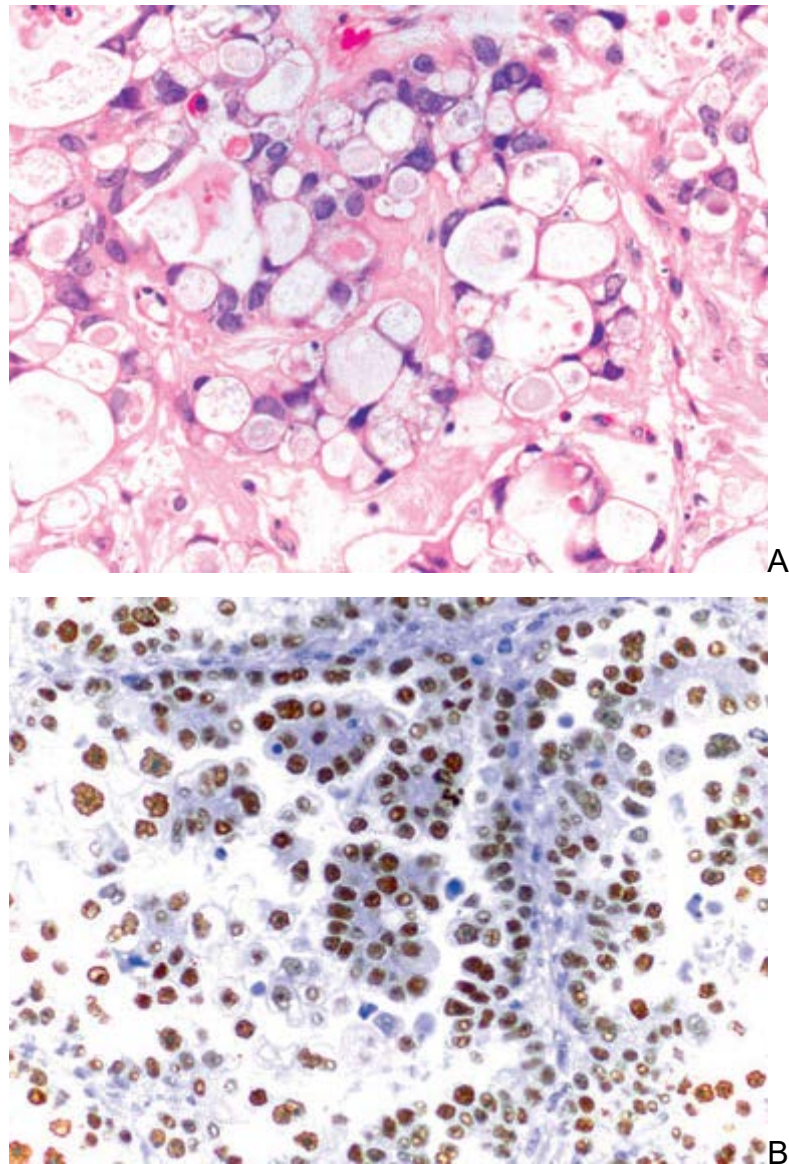
Η «μοριακή ταυτότητα» του STIC παρουσιάζει παρόμοιες γενετικές ανωμαλίες με αυτές του HGSC. Κακοήθη κύτταρα από το STIC θεωρείται πως αποφολιδώνονται από τους κροσσούς και εμφυτεύονται στην ωοθηκική επιφάνεια. Υπερ αυτής της θεωρία είναι η ανεύρεση θετικού εκπλύματος της πυέλου σε ασθενείς μόνο με STIC. Αν και οι αποδείξεις δεν είναι ακόμα αρκετές για να εξαχθούν σίγουρα συμπεράσματα, υπάρχει αυξανόμενη αποδοχή πως μια πλειοψηφία HGSC προέρχεται από το κροσσωτό επιθήλιο του άκρου του σαλπιγγικού σωλήνα.

### *1.3.2 Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα -Clearcellcarcinoma (CCC)*

Το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί περίπου το 5-10% των επιθηλιακών καρκίνων των ωοθηκών. Σε σύγκριση με το HGSC, το διαυγοκυτταρικό διαγιγνώσκεται σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στην τέταρτη με πέμπτη δεκαετία της ζωής τους, σε χαμηλότερο στάδιο νόσου (και άρα με καλύτερη πρόγνωση λόγω της απουσίας απομακρυσμένων μεταστάσεων). Ωστόσο όταν διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο έχει χειρότερη πρόγνωση από τους υπόλοιπους υπότυπους, καθώς απαντά λιγότερο σε συνδυαστική χημειοθεραπεία πλατινούχου σκευάσματος και ταξάνης. Παράλληλα το CCC εμφανίζει μεγαλύτερο κίνδυνο αγγειακών θρομβωτικών επεισοδίων και παρανεοπλασματικής υπερασβεστιαμίας (47).

Ιστοπαθολογικά εμφανίζει συνήθως ανάμεικτο πρότυπο ανάπτυξης με σωληνοκυστικό, θηλώδες και συμπαγές στοιχείο. Ομοίως, οι μεμονωμένοι όγκοι παρουσιάζουν μεικτούς κυτταρικούς πληθυσμούς από διαυγή κύτταρα, hobnail κύτταρα και οξύφιλα κύτταρα (Εικόνα 3).





**Εικόνα 3.** Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα ωθήκης (A), με πυρηνική ανοσοθετικότητα για hepatocyte nuclear factor-1 beta (HNF-1b) (B).

Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα έχουν ένα μοναδικό ανοσοφαινότυπο μεταξύ των επιθηλιακών καρκινωμάτων των ωθηκών. Στερούνται έκφρασης τόσο των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) όσο και του WT-1, μπορούν να έχουν κάποια έκφραση p53, χωρίς αυτή ωστόσο να είναι ισχυρή και διάχυτη όπως στα υψηλής κακοήθειας ορώδη (HGSC). Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα των ωθηκών τυπικά εκφράζουν HIF-1a (hypoxia-inducible factor 1 alpha) γλυπικάνη-3 και HNF-1beta (hepatocyte nuclear factor 1-beta). Ο HNF-1b φαίνεται να είναι ένας ευαίσθητος και ειδικός δείκτης για το διαυγοκυτταρικό καρκίνο των ωθηκών (έκφραση σε ποσοστό 82-100%), με μόνο σπάνιες αναφορές έκφρασης στα άλλα

επιθηλιακά καρκινώματα ωοθηκών (48). Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα τείνουν να παρουσιάσουν χαμηλή μιτωτική και αποπτωτική δραστηριότητα, έναντι των HGSC. Οι κοινές μοριακές ανωμαλίες συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (41).

<b>Clear cell carcinoma: μοριακά χαρακτηριστικά</b>
Περισσότεροι όγκοι διπλοειδικοί ή τετραπλοειδικοί
ARID1A, PIK3CA, PPP2R1A μεταλλάξεις
MSI (micro satellite instability) μικροδορυφορική αστάθεια/ απώλεια έκφρασης mismatch repair protein (MMR)
HNF-1b έκφραση
Τροποποίηση μονοπατιών υποξικής ανάπτυξης (hypoxic growth), αγγειογένεσης και μεταβολισμού γλυκόζης

**Πίνακας 2.** Μοριακές ανωμαλίες σε διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα

Το πλούσιο σε αδενίνη-θυμιδίνη (AT) γονίδιο 1A (ARID1A interactive domain 1 Agene) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BAF250a. Η τελευταία είναι μια από τις βοηθητικές υπομονάδες του SNF–SWI συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, που εμπλέκεται σε ποικιλία λειτουργιών του κυττάρου και αφορούν στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και την επιδιόρθωση του DNA(49). Είναι μεταλλαγμένο σε περίπου 50% των CCC αλλά όχι στα HGSC. Στα CCC συναντάμε σε ποσοστό 43% μεταλλάξεις στην καταλυτική υπομονάδα της PIK3CA. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A) είναι μια φωσφατάσησερίνης /θρεονίνης η οποία εμπλέκεται στην αύξηση και την επιβίωση του κυττάρου, ενώ έχει και ογκοκατασταλτικό ρόλο (50). Το PPP2R1A, είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την α ισομορφή της ρυθμιστικής υπομονάδας του PP2A, και είναι μεταλλαγμένο σε μικρό ποσοστό στο CCC (4%–7%). Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην ανοσιΐστοχημεία, η αύξηση του αριθμού των υποδοχέων του hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1b), τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών συναντάται σε όλα σχεδόν τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης για αυτό τον όγκο. Το CCC

συνδυάζεται με απώλεια έκφρασης των επισκευαστικών πρωτεϊνών (mismatch repair proteins MSL1,MSH2, MSH6 or PMS2) στο 10% των περιπτώσεων.

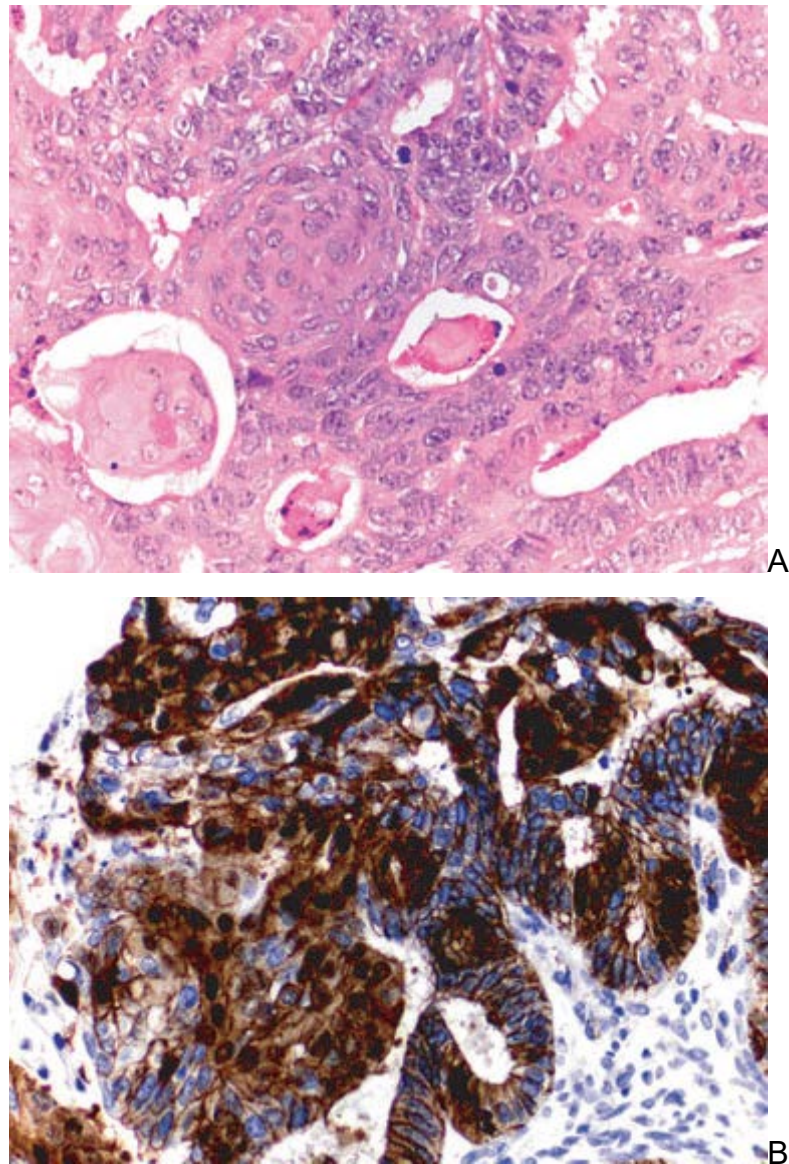
Η συχνή συσχέτιση μεταξύ του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος και της ενδομητρίωσης έχει αναγνωριστεί εδώ και χρόνια (51). Η παρατήρηση, πως μια σημαντική μειοψηφία διαυγοκυτταρικών καρκινωμάτων αναπτύσσεται μέσα σε κύστεις ενδομητρίωσης, υποστηρίζει την υπόθεση αιτιολογικής σχέσης μεταξύ ενδομητρίωσης και διαυγοκυτταρικού καρκινώματος. Η μη τυπική ενδομητρίωση χαρακτηρίζεται από περιοχές έντονης κυτταρικής ατυπίας με μορφολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των διαυγοκυτταρικών καρκινωμάτων, έτσι ώστε η ενδομητρίωση να θεωρείται πρόδρομη του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος. Οι μεταλλάξεις του ARID1A με απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης BAF250a βρέθηκαν τόσο σε εστίες ενδομητρίωσης όσο και σε διαυγοκυτταρικά καρκινώματα. Μεταλλάξεις του PIK3CA απαντώνται συχνά σε CCC, ενώ βρέθηκαν χαρακτηριστικές μεταλλάξεις στο 90% παρακείμενων εστιών ενδομητρίωσης συμπεριλαμβανομένου και 60% των περιπτώσεων χωρίς καθόλου κυτταρική ατυπία σε παρακείμενες σε ενδομητρίωση εστίες (52). Παρά τις ενδείξεις πως κάποια CCC προκύπτουν από εστίες ενδομητρίωσης κάποια μπορεί και όχι, καθώς ένα υποσύνολο των CCC έχει ινοαδενωματώδες υπόβαθρο και πιθανότατα αυτά δε σχετίζονται με εστίες ενδομητρίωσης. Η παρατήρηση της διαφορετικής έκφρασης των μονοπατιών της αγγειογένεσης/υποξίας στα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα, οδήγησε σε προκλινικές μελέτες με χρήση του sunitinib, ενός αναστολέα του μονοπατιού της αγγειογένεσης (που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος του νεφρού), ο οποίος και έδειξε απάντηση σε ζωικά μοντέλα με CCC αλλά όχι με HGSC. Μικρές σειρές ασθενών με διαυγοκυτταρικό καρκίνο ωοθηκών (CCC) έδειξαν ανταπόκριση στη θεραπεία με sunitinib (53), ενώ σε αναδρομικές μελέτες ασθενείς με διαυγοκυτταρικό υπότυπο είχαν καλύτερα αποτελέσματα όταν αντιμετωπίζονταν με ακτινοθεραπεία, αποτέλεσμα που καταδεικνύει την ευπάθεια του όγκου στη στόχευση των μηχανισμών αγγειογένεσης (54). Όλα τα παραπάνω στοιχεία καταδεικνύουν το ενδεχόμενο της απομάκρυνσης από τη συμβατική αναποτελεσματική χημειοθεραπεία, σε πιο αποτελεσματική στοχεύουσα θεραπεία σε ότι αφορά την αντιμετώπιση ειδικά του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος των ωοθηκών. Ωστόσο χρειάζονται προοπτικές μελέτες για να υποστηρίξουν τέτοια σημαντική αλλαγή στη χορηγούμενη θεραπεία.

### 1.3.3 Ενδομητριοειδές καρκίνωμα-Endometrioidcarcinoma (EC)

Το ενδομητριοειδές καρκίνωμα αφορά περίπου το 10% των επιθηλιακών καρκινωμάτων των ωοθηκών και είναι συνήθως χαμηλού βαθμού κακοήθειας και χαμηλού σταδίου κατά τη διάγνωση (αν και μπορεί να εξελιχθεί και σε υψηλής κακοήθειας καρκίνωμα το οποίο τόσο μορφολογικά όσο και μοριακά διαφοροδιαγιγνώσκεται δύσκολα σε σχέση με τα υψηλού βαθμού κακοήθειας ορώδη καρκινώματα). Τα ενδομητριοειδή καρκινώματα έχουν καλύτερη πρόγνωση.

Το ενδομητριοειδές καρκίνωμα (EC) των ωοθηκών εμφανίζει παρόμοιο φάσμα μορφολογικών χαρακτηριστικών με αυτό που παρατηρείται στο ενδομητριοειδές καρκίνωμα του ενδομητρίου, ενώ σε ποσοστό 15-20% μπορεί να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ καρκίνου ενδομητρίου και ενδομητριοειδές καρκίνωμα των ωοθηκών. Στην περίπτωση της ύπαρξης και των δυο, η πιθανότητα το νεόπλασμα ωοθηκών να είναι μεταστατική νόσος από αυτό του ενδομητρίου, είναι πολύ υψηλή, αν και τα υπόλοιπα σενάρια αφορούν σε μετάσταση από την ωοθήκη στο ενδομήτριο, καθώς και συνύπαρξη των δύο κακοηθειών.

Μακροσκοπικά, τα ενδομητριοειδή καρκινώματα μπορεί να εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Μπορεί να είναι κυστικά ή συμπαγή, με συνοδέςυπολειπόμενες εστίες ενδομητρίωσης οι οποίες μοιάζουν με τυπικές σοκολατοειδείς κύστες. Η εξωτερική επιφάνεια είναι συνήθως λεία, και η εντόπιση συνήθως ετερόπλευρη, καθώς η αμφοτερόπλευρη συνηγορεί πιο πολύ για μετάσταση από πρωτοπαθές καρκίνωμα ενδομητρίου. Το θηλώδες πρότυπο ανάπτυξης που συναντάμε στην ορώδη ιστολογία, συνήθως απουσιάζει, αν και μπορεί να υπάρξουν περιοχές με αιμορραγία και νεκρώσεις. Το αδενικό πρότυπο ανάπτυξης με κατά τόπους πλακώδη διαφοροποίηση, είναι το πιο συχνά εμφανιζόμενο πρότυπο (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα με εστιακή πλακώδη διαφοροποίηση (Α). Όγκοι με σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της beta catenin εμφανίζουν πυρηνική εντόπιση της b-catenin (Β)

Ανοσοφαινοτυπικά, τα χαμηλού βαθμού κακοηθείας ενδομητριοειδή καρκινώματα των ωθηκών, εκφράζουν δείκτες παρόμοιους με το ενδομητριοειδές καρκίνωμα του ενδομητρίου. Το νεόπλασμα εκφράζει βιμεντίνη, ER, PR, PAX-8 και CA125. Είναι αρνητικά στην έκφραση ή εκφράζουν εστιακά p16 και p53, είναι αρνητικά για WT-1, καλρετίνη και ινχιμπίνη. Τα υψηλού βαθμού κακοηθείας ενδομητριοειδή καρκινώματα των ωθηκών, έχουν παρόμοιο προφίλ με το HGSC, με διάχυτη και ισχυρή έκφραση p53, p16 και WT-1, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι το καρκίνωμα ενδομητριοειδούς τύπου υψηλού βαθμού κακοήθειας, δεν είναι

παρά ένας υπότυπος του υψηλού βαθμού κακοήθειας ορώδους καρκινώματος (HGSC).

Οι κοινές μοριακές ανωμαλίες στα ενδομητριοειδή καρκινώματα συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

<b>Endometrioid carcinoma: μοριακά χαρακτηριστικά</b>
PTEN, CTNNB1, ARID1A, PPP2R1A μεταλλάξεις
MSI (Microsatellite instability μικροδορυφορική αστάθεια) / απώλεια έκφρασης MMR (mismatch repair protein)

**Πίνακας 3.** Μοριακές ανωμαλίες σε ενδομητριοειδές καρκίνωμα

Μεταλλάξεις των ARID1A και PPP2R1A υπάρχουν τόσο στο CCC όσο και στο EC, με το 30% των EC να εμφανίζουν μεταλλάξεις στο ARID1A και το 12% στο PPP2R1A. Σωματικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 3 όσο και στο γονίδιο της b-catenin (CTNNB1) εμφανίζονται σε 38%–50% των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων, με πυρηνική b-catenin να ανιχνεύεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των περιστατικών (Εικόνα 4B). Μεταλλάξεις του PTEN στα εξόνια 3 και 8, συμβαίνουν στο 20% των περιπτώσεων των ενδομητριοειδών (55). Μεταλλάξεις PI3KCA υπάρχουν και στα ενδομητριοειδή, αλλά είναι λιγότερο συχνές από ότι στα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα (56). Τα ενδομητριοειδή σχετίζονται με απώλεια έκφρασης επιδιορθωτικών πρωτεϊνών (MLH1, MSH2, MSH6 ή PMS2) στο 10% των περιπτώσεων. Ανεξάρτητα από ότι ισχύει στο διαυγοκυτταρικό, η συσχέτιση μεταξύ ενδομητριοειδούς και ενδομητρίωσης είναι καλά αποδεδειγμένη. Η δυνητικά πρόδρομη μορφή, η οποία αποκαλείται οριακής κακοήθειας, είναι μορφολογικά παρόμοια με την άτυπη υπερπλασία του ενδομητρίου. Παρά τα παραπάνω, πιστεύεται πως υπάρχει υποκατηγορία ενδομητριοειδών καρκινωμάτων που δε σχετίζονται με την παρουσία εστιών ενδομητρίωσης και διαφέρουν από αυτά που σχετίζονται με την ενδομητρίωση (όπως χαρακτηριστική είναι η έκφραση WT1). Θεωρείται πως αυτά τα ενδομητριοειδή καρκινώματα των ωοθηκών, τα μη σχετιζόμενα με ενδομητρίωση, αφορούν σε υψηλού βαθμού κακοήθειας ορώδη καρκινώματα των ωοθηκών με κυρίαρχο το αδενικό πρότυπο

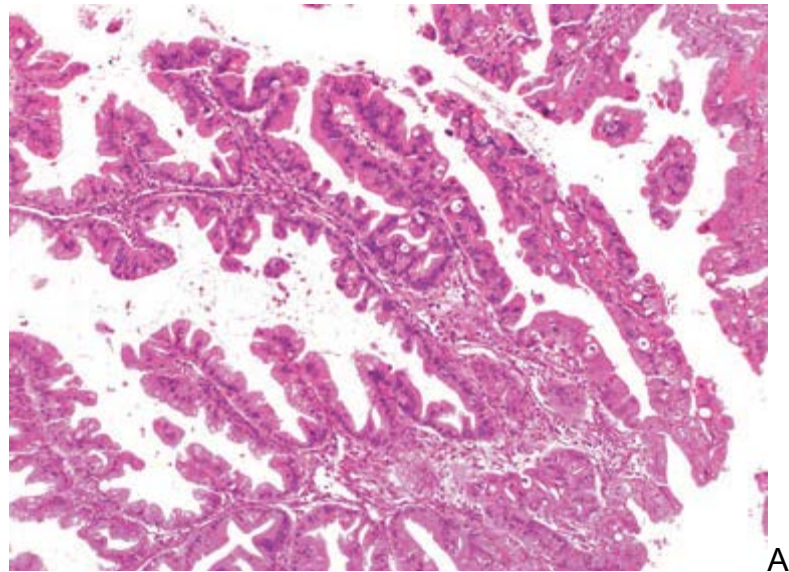
διαφοροποίησης (57). Παρά την καλή πρόγνωση των ενδομητριοειδών, μελέτες ειδικές για αυτή την υποκατηγορία προκειμένου να αλλάξει το είδος της χορηγούμενης θεραπείας, δεν έχουν γίνει. Για παράδειγμα, για νόσο σταδίου ΙΑ χαμηλής κακοήθειας ενδομητριοειδές, δε χρειάζεται περαιτέρω χειρισμός πέραν της χειρουργικής εξαίρεσης (58). Σε υψηλότερα στάδια της νόσου, όπου η επικουρική θεραπεία έχει ένδειξη, η συμβατική θεραπεία με συνδυασμό πλατινούχου/ταξάνης παραμένει η μοναδική επιλογή. Πιθανές στοχεύουσες θεραπείες που θα αναπτυχθούν για το πιο συχνό ενδομητριοειδές καρκίνωμα του ενδομητρίου, θα μπορούσαν να δοκιμαστούν και στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών λόγω των κοινών μεταλλάξεων των δυο νόσων.

#### 1.3.4 Βλεννώδες καρκίνωμα – *Mucinous carcinoma (MC)*

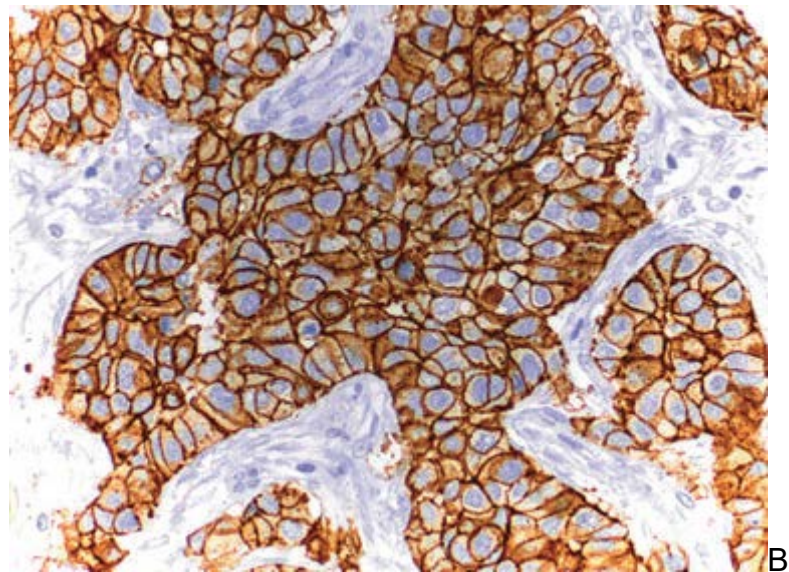
Τα βλεννώδη καρκινώματα της ωοθήκης είναι από τα λιγότερο μελετημένα επιθηλιακά καρκινώματα των ωοθηκών λόγω της σπάνιας συχνότητας εμφάνισης τους, καθώς αποτελούν μόλις το 2-4% του συνόλου του καρκίνου ωοθηκών. Και τα βλεννώδη εμφανίζονται συνήθως σε περιεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά την τέταρτη ή πέμπτη δεκαετία της ζωής τους. Η πλειοψηφία των βλεννώδων όγκων της ωοθήκης είναι όγκοι οριακής κακοήθειας ή όγκοι σταδίου Ι. Δεδομένου ότι τα βλεννώδη διαγιγνώσκονται σε αρχικά στάδια της νόσου, έχουν γενικά καλή πρόγνωση έτσι ώστε το στάδιο Ια, καλής και μέτριας διαφοροποίησης μπορεί να αντιμετωπισθεί μόνο με χειρουργική εξαίρεση χωρίς επικουρική χημειοθεραπεία. Η διατήρηση της γονιμότητας είναι επίσης μια επιλογή, καθώς τα βλεννώδη καρκινώματα έχουν σπανίως αμφοτερόπλευρη εντόπιση. Η υποτροπιάζουσα ή μεταστατική νόσος ωστόσο σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση ενώ οι υποτροπές μπορεί να εντοπιστούν σε ασυνήθεις θέσεις (για καρκίνο των ωοθηκών) όπως στα οστά ή στους πνεύμονες.

Μακροσκοπικά, πρόκειται για όγκους από 8cm έως και 20cm που μπορεί ωστόσο να είναι και μεγαλύτεροι. Τυπικά είναι κυστικοί όγκοι, ετερόπλευροι, περιοριζόμενοι στην ωοθήκη. Τα αμφοτερόπλευρα νεοπλασμάτα είναι συνήθως μεταστάσεις από όγκους του γαστρεντερικού. Οι πρωτοπαθείς βλεννώδεις όγκοι των ωοθηκών δεν παρουσιάζονται ως ψευδομύζωμα περιτοναίου. Αν και το ψευδομύζωμα περιτοναίου θεωρούταν ότι ήταν αποτέλεσμα ρήξης πρωτοπαθούς βλεννώδους όγκου ωοθηκών, πλέον θεωρείται πως προέρχεται από μετάσταση συνήθως από όγκο της σκωληκοειδούς απόφυσης. Τα βλεννώδη καρκινώματα,

όπως άλλωστε φαίνεται και από το όνομά τους, χαρακτηρίζονται από την παρουσία βλέννας μέσα στο καρκινικό κύτταρο, το οποίο προσομοιάζει πολύ με κύτταρο προερχόμενο από το γαστρεντερικό. (Εικόνα 5)

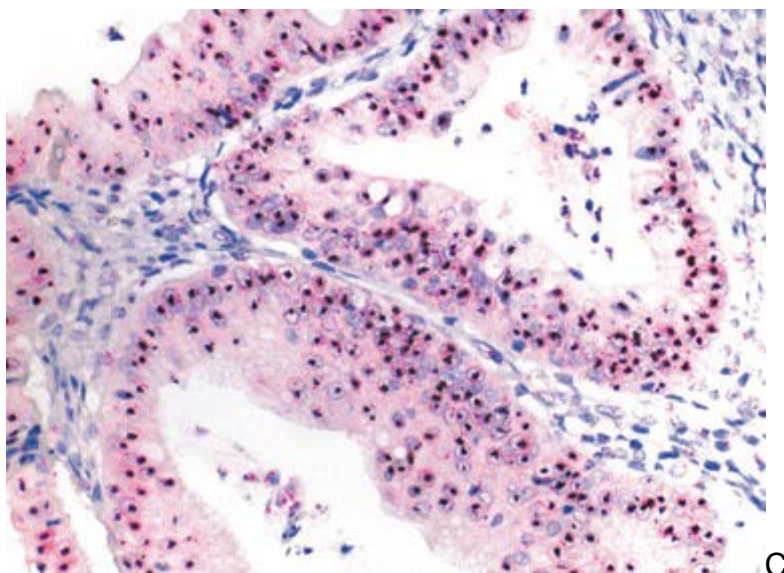


A



B





**Εικόνα 5.** Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα ωθήκης (A), 15% παρουσιάζουν υπερέκφραση του HER2 με μεμβρανική χρώση μέσω ανοσοϊστοχημείας (B). Chromogenic in-situ hybridization (CISH) που δείχνει ενίσχυση του HER2(C)

Η παραγωγή βλέννας είναι κυρίαρχη στους όγκους οριακής κακοήθειας ενώ όσο ο όγκος εξελίσσεται σε διηθητικό καρκίνωμα, η παραγωγή βλέννας μέσα στα κύτταρα είναι λιγότερο εμφανής, ενώ σε υποτροπιάζουσα πλέον νόσο η παραγωγή βλέννας, στηριζόμενη στη διάγνωση με οπτικό μικροσκόπιο, μπορεί να απουσιάζει.

Το βλεννώδες καρκίνωμα των ωθηκών συχνά εκφράζει τους γαστρεντερικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των CK20 και CDX2, καθώς και την έκφραση του CK7 (59). Μπορεί να υπάρχει εστιακή έκφραση του p16 ενώ συνήθως είναι όγκος αρνητικός για ER, PR, WT-1 και CA125. Επομένως, η ανοσοϊστοχημεία συχνά δεν βοηθάει στη διαφοροδιάγνωση της προέλευσης του βλεννώδους καρκινώματος (πρωτοπαθής νόσος ωθηκών ή μεταστατική βλάβη).

Οι πιο συχνές μοριακές ανωμαλίες που διαπιστώνονται στα βλεννώδη καρκινώματα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

<b>Mucinous carcinoma: μοριακά χαρακτηριστικά</b>
KRAS μεταλλάξεις
HER2 ενίσχυση και υπερέκφραση*
*HER2 ενίσχυση και KRAS μετάλλαξη σχεδόν αλληλοαποκλείονται (mutually exclusive)

**Πίνακας 4.** Μοριακές ανωμαλίες σε βλεννώδες καρκίνωμα

Οι μεταλλάξεις του KRAS εμφανίζονται στο 75% των πρωτοπαθών εντοπίσεων βλεννώδων καρκινωμάτων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως ενίσχυση και υπερέκφραση του γονιδίου HER2 είναι παρούσα στο 15% των βλεννώδων καρκινωμάτων (Εικόνα 5B,C). Η μετάλλαξη του KRAS και η ενίσχυση του HER2 είναι σχεδόν αμοιβαία αποκλειόμενες, ενώ στην περίπτωση όπου απουσιάζουν και οι δυο χρώσεις, η πρόγνωση είναι χειρότερη (60). Η παθογένεση του βλεννώδους καρκινώματος δεν είναι καλά αντιληπτή. Τα περισσότερα βλεννώδη καρκινώματα σχετίζονται με κατά τόπους ύπαρξη καλοήθους βλεννώδους επιθηλίου, βλεννώδη όγκο οριακής κακοήθειας εντερικού τύπου ή και με τα δυο στοιχεία. Μεταλλάξεις του KRAS βρίσκονται τόσο σε ιστολογικά καλοήθη στοιχεία καθώς και σε οριακής κακοήθειας στοιχεία, όσο και σε γειτονικές περιοχές καρκινώματος, υποστηρίζοντας μια διαδοχική εξέλιξη της ογκογένεσης από το βλεννώδες κυσταδένωμα, στο βλεννώδη οριακής κακοήθειας όγκο εντερικού τύπου και το βλεννώδες καρκίνωμα (61).

Η βλεννώδης μεταπλασία σπάνια παρατηρείται σε φλοιϊκές κύστες έτσι ώστε αυτές να μην είναι συνήθεις εντοπίσεις βλεννώδους καρκινώματος. Οι όγκοι Brenner και οι κύστες Walthard, συχνά εμφανίζουν βλεννώδη μεταπλασία και σχετίζονται με βλεννώδεις όγκους. Αν και δεν έχουν βρεθεί μοριακά δεδομένα που να υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία, πιστεύεται πως οι βλεννώδεις όγκοι προέρχονται από εστίες μεταβατικού επιθηλίου στην παρα-ωοθηκικο-σαλπιγγική συμβολή (para-ovarian tuboperitoneal junction). Το βλεννώδες καρκίνωμα σπάνια επίσης μπορεί να προέρχεται από βλαστικά κύτταρα (germ cell) τα οποία ανήκουν σε ένα τεράτωμα. Τα βλεννώδη καρκινώματα συνήθως εντοπίζονται στην ωοθήκη κατά τη διάγνωση και μπορούν να αντιμετωπιστούν με στόχο την ίαση μόνο με

χειρουργική εξαίρεση. Η μεταστατική νόσος και οι υποτροπές αποτελούν ωστόσο μια πρόκληση καθώς συνήθως δεν είναι ευαίσθητες σε χημειοθεραπεία με βάση πλατινούχο σκεύασμα. Η ανακάλυψη της υπερέκφρασης του HER2 σε ένα 15% των βλεννώδων καρκινωμάτων δίνει την ενδεχόμενη δυνατότητα χορήγησης trastuzumab (62). Κρίνοντας βάσει της εμπειρίας από τη θεραπευτική αντιμετώπιση του KRAS μεταλλαγμένου καρκίνου του παχέος εντέρου, η χορήγηση anti-EGFR (στόχευση κατά του epidermal growth factor receptor) σε βλεννώδη καρκινώματα με μετάλλαξη θα αποτύγχανε, οπότε οι αναστολείς του EGFR μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο στη μειοψηφία των ασθενών με KRAS wild-type βλεννώδες καρκίνωμα. Σε περιπτώσεις με μετάλλαξη του KRAS και χωρίς ενίσχυση του HER2, οι οποίες και αποτελούν την πλειοψηφία των περιστατικών με βλεννώδες καρκίνωμα, καμία καινούργια θεραπευτική επιλογή δεν είναι διαθέσιμη στην παρούσα φάση.

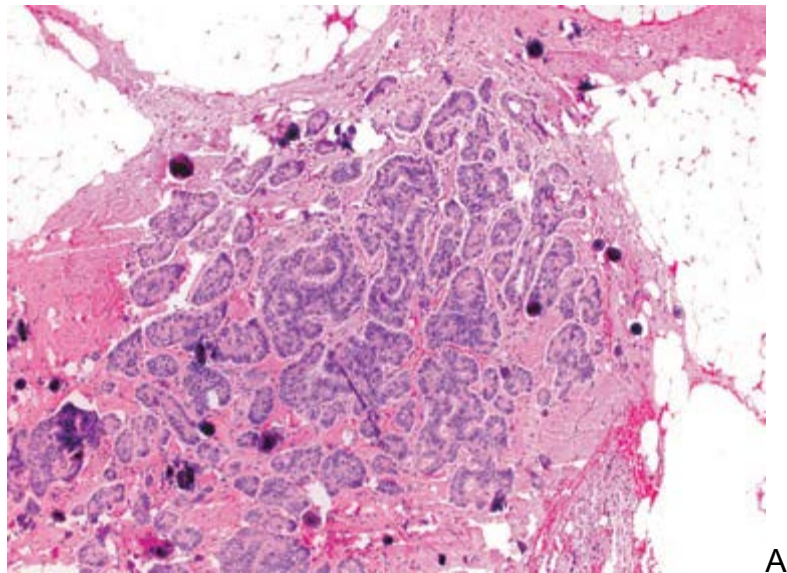
#### 1.3.5 Χαμηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα - *Low-grade serous carcinoma (LGSC)*

Σχετικά πρόσφατα έχει γίνει αποδεκτό ότι το χαμηλής κακοήθειας (LGSC) και το υψηλής κακοήθειας (HGSC) ορώδες καρκίνωμα των ωθηκών είναι δύο απολύτως διαφορετικές νοσολογικές οντότητες, διαφορετικοί όγκοι με διαφορετικούς πρόδρομους και διαφορετικά μοριακά μονοπάτια καρκινογένεσης.

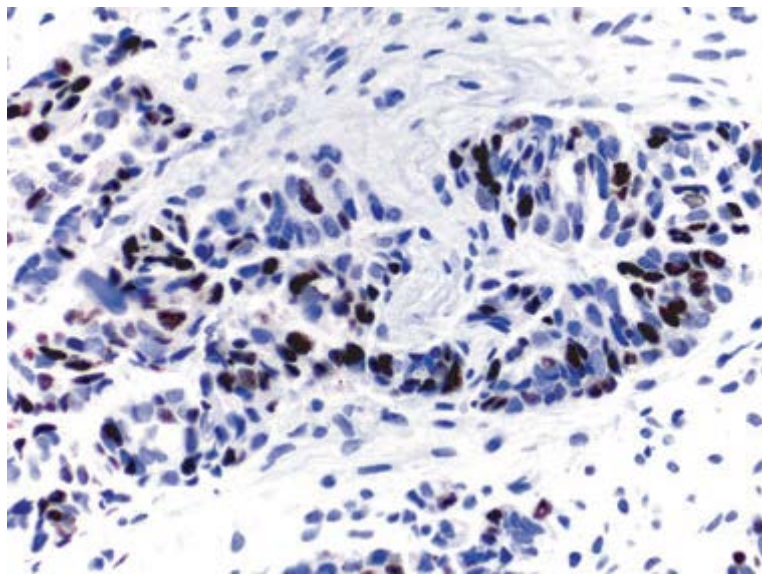
Σε αντίθεση με τα HGSC, τα LGSC είναι ασυνήθεις όγκοι και αποτελούν μόλις το 2% των επιθηλιακών καρκίνων των ωθηκών. Μπορεί να είναι συμπαγή ή κυστικά μορφώματα, με θηλώδεις προσεκβολές είτε εντός των κύστεων είτε στην επιφάνεια των ωθηκών. Σε σύγκριση με HGSC εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά αιμορραγίας και νεκρώσεων.

Τα χαμηλής κακοήθειας ορώδη καρκινώματα (LGSC) είναι τυπικά όγκοι με βραδύ ρυθμό ανάπτυξης που εμφανίζονται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο νόσου. Συνυπάρχουν με οριακής κακοήθειας ορώδη καρκινώματα και θεωρούνται ίσως εξέλιξη ενός όγκου οριακής κακοήθειας.

Τα LGSC διακρίνονται από τα HGSC βάσει του μεγέθους του πυρήνα, με δευτερεύον κριτήριο το μιτωτικό δείκτη (<13 μιτώσεις/10 ΜΟΠ) (13 mitotic figures/10 high-powerfields) (Εικόνα 6).



A



B

**Εικόνα 6.** Χαμηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα (LGSC) διηθεί το γύρω λίπος (A). Διάχυτη πυρηνική χρώση p53 χαρακτηρίζει το υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα ενώ η κατά τόπους χρώση όπως αναδεικνύεται εδώ υποστηρίζει τη διάγνωση του LGSC (B)

Οι μοριακές ανωμαλίες των LGSC συνοψίζονται στον πίνακα:

<b>Low-grade serous carcinoma: μοριακά χαρακτηριστικά</b>
Γενωμική σταθερότητα/διπλοειδία ή σχεδόν διπλοειδία
BRAF or KRAS μεταλλάξεις
Έκφραση υποδοχέων ER/PR

## Πίνακας 5. Μοριακές ανωμαλίες σε χαμηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα

Τα LGSC είναι διπλοειδικοί όγκοι ή σχεδόν διπλοειδικοί με ελάχιστες σημειακές μεταλλάξεις. Τα LGSC έχουν μεταλλάξεις των KRAS ή BRAF στο 60%–70% των περιπτώσεων. Οι μεταλλάξεις στο KRAS και BRAF οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK (the mitogen activated protein kinase pathway-κινασών σερίνης/θρεονίνης) (63). Οι μεταλλάξεις σε KRAS και BRAF είναι αμοιβαία αλληλοαποκλειόμενες. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η μικρή πιθανότητα ύπαρξης μετάλλαξης του BRAF σε LGSC που διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο, παρατήρηση που υποδηλώνει πως η έλλειψη μετάλλαξης σχετίζεται με πιο επιθετική συμπεριφορά και χειρότερη πρόγνωση (64). Κάτι ανάλογο, όπως ήδη προαναφέραμε, ισχύει και με τα βλεννώδη καρκινώματα όπου έλλειψη μεταλλάξεων του KRAS ή ενίσχυσης του HER2 σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση (65). Μετάλλαξη του HER2 είναι παρούσα στο 9% των χαμηλής κακοήθειας ορώδων όγκων (LGSC), και συνήθως δε συνυπάρχει με μεταλλάξεις σε KRAS και BRAF. Σε αντίθεση με τα HGSC, οι μεταλλάξεις του TP53 είναι σπάνιες στα LGSC (Εικόνα 6B). Υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και/ή προγεστερόνης (PR) εκφράζονται στα περισσότερα LGSC. Τα χαμηλής κακοήθειας ορώδη καρκινώματα (LGSC) συνήθως συνυπάρχουν με οριακής κακοήθειας στοιχείο όπως έχει ήδη προαναφερθεί, το οποίο και εμφανίζει χαρακτηριστικές μοριακές αλλαγές. Οι τελευταίες ουσιαστικά υποδηλώνουν κλωνική σχέση. Τα ορώδη κυσταδενώματα που περιέχουν λιγότερο από 10% επιθηλιακή ατυπία, υποκρύπτουν μεταλλάξεις των KRAS και BRAF, κάτι που υποδηλώνει ίσως πως αυτή η βλάβη είναι πρόδρομος στο μονοπάτι της καρκινογένεσης.

Μια πρόσφατα περιγραφείσα βλάβη, η θηλώδης – σωληνώδης υπερπλασία των κροσσών (papillary tubal hyperplasia of the fimbria), έχει προταθεί ως ο πρόδρομος του LGSC. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, τα σωληνώδη επιθηλιακά κύτταρα αποπίπτουν από τους κροσσούς και εμφυτεύονται στην επιφάνεια των ωοθηκών. Αυτά τα κύτταρα αρχικά δημιουργούν απλές κύστες οι οποίες στη συνέχεια εξελίσσονται σταδιακά σε κυσταδενώματα, όγκους οριακής κακοήθειας και σε LGSC (66). Περισσότερες μελέτες χρειάζονται για να ελεγχθεί η παραπάνω θεωρία, γεγονός που είναι αρκετά δύσκολο δεδομένης της σπανιότητας εμφάνισης των συγκεκριμένων όγκων (LGSC).

Τα χαμηλής κακοήθειας ορώδη καρκινώματα δεν ανταποκρίνονται στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία όπως τα υψηλής κακοήθειας. Λόγω αφενός της μικρής τους συχνότητας εμφάνισης και αφετέρου της πρόσφατης αναγνώρισής τους ως ξεχωριστή νοσολογική οντότητα, καμία ευρέως αποδεκτή εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση δεν έχει προταθεί. Η ορμονική θεραπεία έχει αξιολογηθεί δεδομένης της συχνής έκφρασης ορμονικών υποδοχέων σε αυτούς τους όγκους και έχει δείξει μέτρια αντινεοπλασματική δραστηριότητα κατά την υποτροπιάζουσα νόσο (67). Η στόχευση μορίων στο μονοπάτι των RAS σε όγκους με ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του RAS π.χ αναστολείς των MEK πρωτεϊνών, έχει προταθεί και αναμένονται δεδομένα πάνω σε τέτοιες μελέτες. Λόγω της σχετικά αργής αλλά εξελισσόμενης φύσης των LGSC, πολλαπλές θεραπευτικές προσεγγίσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε κάθε μεμονωμένο ασθενή στο πλαίσιο υποτροπιάζουσας νόσου, επιτρέποντας ανεπίσημες αξιολογήσεις διαφορετικών θεραπειών.

Γενικότερα μπορούμε να πούμε πως η εξατομικευμένη ιατρική έχει πλέον τα τελευταία χρόνια εισαχθεί στην καθημερινή κλινική πράξη, στηριζόμενη στην κατανόηση της μοριακής παθολογίας των διαφορετικών υποτύπων του επιθηλιακού καρκίνου των ωθηκών, πρόοδος που θα οδηγήσει στη στοχεύουσα θεραπεία του καρκίνου των ωθηκών. Η ιστοπαθολογική εξέταση και η ακριβής διάγνωση του κάθε υπότυπου, έχουν γίνει όλο και περισσότερο σημαντικές στην καθοδήγηση της θεραπευτικής αντιμετώπισης κάθε ασθενούς. Η εργασία που θα πραγματοποιηθεί στα επόμενα χρόνια, θα προσπαθήσει να εκμεταλλευτεί τις συγκεκριμένες μοριακές ανωμαλίες των υποκατηγοριών των ωθηκικών καρκινωμάτων με στόχο την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής στοχεύουσας και ενδεχομένως εξατομικευμένης θεραπείας.

## *1.4 Διάγνωση*

### *1.4.1 Συμπτώματα και σημεία*

Τα πιο συχνά συμπτώματα με τα οποία εμφανίζονται οι ασθενείς είναι κοιλιακό άλγος, δυσφορία, αίσθημα πλήρωσης, αλλαγές των συνηθειών του εντέρου, πρόωρος κορεσμός, δυσπεψία και μετεωρισμός. Η παρουσία πυελικής μάζας κατά την κλινική εκτίμηση είναι σημαντικό στοιχείο για να θέσει την υπόνοια καρκίνου των ωθηκών. Συχνά οι ασθενείς μπορεί να διαγνωσθούν με εικόνα αποφρακτικού ειλεού λόγω ενδοκοιλιακών μαζών ή με δύσπνοια λόγω

πλευριτικών συλλογών. Σε αρχικά στάδια της νόσου σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μπορεί να παρουσιαστούν διαταραχές εμμηνορρυσίας, ενώ αν η μάζα πιέζει την ουροδόχο κύστη ή το ορθό μπορεί να εμφανισθούν δυσουρικά ενοχλήματα ή/και δυσκοιλιότητα. Σπανιότερα μπορεί να εμφανιστεί άλγος υπογαστρίου ή δυσπαρεύνια, ενώ οξεία συμπτωματολογία όπως πόνος λόγω ρήξεως ή συστροφής είναι σπάνια.

Σε προχωρημένα στάδια της νόσου οι ασθενείς έχουν συνήθως συμπτώματα λόγω κοιλιακής διάτασης είτε στο πλαίσιο ασκικτικής συλλογής είτε λόγω των μαζών. Τα συμπτώματα αφορούν σε αίσθημα κοιλιακής διάτασης, μετεωρισμό, δυσκοιλιότητα, ναυτία, ανορεξία ή πρόωρο κορεσμό. Σε ασθενείς με νόσο σταδίου IV, συχνά αναφέρεται δύσπνοια λόγω πλευριτικών συλλογών. Επί παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων, μεγάλοι βουβωνικοί, μασχαλιαίοι ή υπερκλείδιοι λεμφαδένες μπορεί να είναι ακόμα και κλινικά ψηλαφητοί.

#### *1.4.2 Ορολογικοί καρκινικοί δείκτες*

Τα επίπεδα στον ορό του CA125 χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτης στην αρχική εκτίμηση, ύποπτης για επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών μάζας των εξαρτημάτων (68). Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να υπάρξουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα καθώς το CA125 αυξάνεται στον ορό και σε καλοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με φλεγμονώδη αντίδραση του περιτοναίου όπως είναι η ενδομητρίωση (69), αδеноμύωση, φλεγμονώδης νόσος της πυέλου, εμμηνορρυσία, αδενώματα της μήτρας ή καλοήθεις κύστεις. Επίσης η μέση τιμή του CA125 ποικίλλει ανάλογα με την εθνικότητα και το κάπνισμα (χαμηλότερα επίπεδα σε γυναίκες που δεν ανήκουν στη λευκή φυλή και είναι ενεργείς καπνίστριες), ενώ αυξάνει με την ηλικία (70). Σε μια αναδρομική μελέτη που είχε διενεργηθεί στη Σουηδία και αφορούσε σε 5.550 γυναίκες, οι 175 είχαν αυξημένα επίπεδα CA125 στον ορό. Επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών διαγνώσθηκε μόνο σε έξι (6) από αυτές τις γυναίκες ενώ αναπτύχθηκε και σε τρεις άλλες με φυσιολογικά επίπεδα CA125 στον ορό. Η ειδικότητα αυτής της μέτρησης είναι 98,5% για γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 50ετών ενώ είναι αρκετά χαμηλότερη για γυναίκες κάτω των 50 ετών (94,5%) (71).

#### *1.4.3 Απεικονιστικές μέθοδοι*

Το διακολλικό υπερηχογράφημα συχνά συμπεριλαμβάνεται στην αρχική εκτίμηση μιας πνευμονικής μάζας. Στοιχεία υπέρ προχωρημένου καρκίνου των ωοθηκών είναι η παρουσία στα εξαρτήματα μαζών με συμπαγή και κυστικά στοιχεία, με συχνή την ύπαρξη διαφραγματίων, ο ασκίτης ή/και η παρουσία περιτοναϊκών μεταστάσεων. Ο συνδυασμός του CA125 και του διακολλικού υπερηχογραφήματος ως μεθόδου screening του πληθυσμού για έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών μοιάζει αποτελεσματικός. Σε μια μεγάλη μελέτη, 202.638 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (ηλικίας 50-74 ετών) τυχαιοποιήθηκαν σε τρία σκέλη, σε απουσία προσυμπτωματικού ελέγχου όποιας μορφής ή σε ετήσιο έλεγχο με μέτρηση CA125 σε συνδυασμό με διακολλικό υπερηχογράφημα ή τέλος σε ετήσιο έλεγχο μόνο με διακολλικό υπερηχογράφημα. Η μελέτη έδειξε πως ο συνδυασμός είχε μεγαλύτερη ειδικότητα σε σχέση με το διακολλικό υπερηχογράφημα από μόνο του, σε ότι αφορά τη διάγνωση πρωτοπαθούς καρκίνου των εξαρτημάτων (ωοθηκών και σαλπίγγων) (72). Παρά τα υποσχόμενα αποτελέσματα, ο συνδυασμός των δυο μεθόδων (multimodal screening) δε θεωρείται καθημερινή πρακτική (gold standard) στην προσπάθεια έγκαιρης διάγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών. Άλλες νεότερες απεικονιστικές τεχνικές όπως ο μαγνητικός συντονισμός (MRI) ή η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) μπορούν να μας δώσουν περισσότερες πληροφορίες αλλά δε συμπεριλαμβάνονται απαραίτητα στον προεγχειρητικό έλεγχο. Στόχος με τις διαφορετικές απεικονιστικές μεθόδους στον καρκίνο των ωοθηκών είναι η διάκριση καλοθών μαζών των εξαρτημάτων από αυτές που απαιτούν περαιτέρω ιστοπαθολογική εκτίμηση. Για βλάβες με μεικτά στοιχεία από υπερηχογράφημα, η μαγνητική τομογραφία αυξάνει την ειδικότητα της αξιολόγησης μειώνοντας έτσι τις αφαιρέσεις καλοθών βλαβών. Η αξονική τομογραφία (CT) είναι χρήσιμη στη διάγνωση και το σχεδιασμό αντιμετώπισης προχωρημένου σταδίου καρκίνου. Αν και μάζες ωοθηκών με αυξημένη πρόσληψη του ραδιοφαρμάκου σε PET θεωρούνται ύποπτες για κακοήθεια, το PET/CT δεν έχει θέση στην αρχική εκτίμηση των ύποπτων μαζών λόγω υψηλών ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συνοπτικά η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων διάγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών:



Εξέταση	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
	82-91	68-81
Έγχρωμη Doppler Υπερηχογραφία	86	91
Αξονική Τομογραφία (CT)	90	75
Μαγνητική Τομογραφία (MRI)	91	88
PET Τομογραφία	67	79
Προσδιορισμός επιπέδων Ca-125	78	7

**Πίνακας 6.** Διαγνωστικές μέθοδοι καρκίνου ωοθηκών

#### 1.4.4 Ιστολογική διάγνωση

Για τη διάγνωση της νόσου απαιτείται βιοψία της ύποπτης μάζας ενώ ισχύουν τα εξής:

α) Μάζες < 8cm σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι καλοήθεις κύστεις στις περισσότερες περιπτώσεις. Η κυστική φύση της μάζας πρέπει να επιβεβαιώνεται υπερηχογραφικά όπως προαναφέρθηκε. Οι ασθενείς λαμβάνουν αγωγή με από του στόματος αντισυλληπτικά για 2 μήνες, αγωγή η οποία πρέπει να προκαλέσει υποστροφή της μάζας εφόσον αυτή είναι όντως καλοήθης κύστη.

β) Χειρουργική διερεύνηση είναι απαραίτητη στις ακόλουθες περιπτώσεις:

1) Μάζες < 8cm και με κυστική εικόνα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που δεν υποχωρούν μετά από δίμηνη παρακολούθηση.

2) Μάζες < 8cm αλλά με συμπυκνή υπερηχογραφική εικόνα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

3) Μάζες > 8cm σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

4) Όλες οι μάζες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

#### 1.4.5 Σταδιοποίηση και προγνωστικοί παράγοντες

Η χειρουργική σταδιοποίηση απαιτεί λαπαροτομία με μέση τομή έτσι ώστε το χειρουργικό πεδίο να είναι επαρκές προκειμένου να ελεγχθεί ολόκληρη η κοιλιακή

κοιλότητα σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες της FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics). Εάν η νόσος μοιάζει περιορισμένη στις ωοθήκες, η σταδιοποίηση περιλαμβάνει τη λήψη βιοψιών από το διαφραγματικό περιτόναιο, τις παρακολικές αύλακες, το πυελικό περιτόναιο, ολική ή επιλεκτική λεμφαδενεκτομή πυελικών και παρα-αορτικών λεμφαδένων, επιπλεκτομή, λήψη τεσσάρων εκπλυμάτων της περιτοναϊκής κοιλότητας (από το διάφραγμα, δεξιά και αριστερή πλευρά της κοιλιάς, πύελο) και τέλος την ολική υστερεκτομή και την αμφωσαλπιγγο-ωοφορεκτομή (total abdominal hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy –TAH/BSO), καθώς και την αφαίρεση του τυφλού, όταν αναφερόμαστε σε βλεννώδη όγκο των ωοθηκών.

Στον επόμενο πίνακα φαίνεται η διεθνής σταδιοποίηση κατά FIGO που ισχύει:

ΣΤΑΔΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
I	Νόσος περιορισμένη στις ωοθήκες
Ia	Νόσος περιορισμένη στη μία ωοθήκη, χωρίς ασκитικό υγρό με κακοήθη κύτταρα, χωρίς παρουσία του όγκου στις εξωτερικές επιφάνειες, με άθικτη κάψα
Ib	Νόσος περιορισμένη στις δύο ωοθήκες, χωρίς ασκитικό υγρό με κακοήθη κύτταρα, χωρίς παρουσία του όγκου στις εξωτερικές επιφάνειες, με άθικτες κάψες
Ic	Όγκος Ia ή Ib αλλά με παρουσία στην επιφάνεια της μιας ή και των δύο ωοθηκών ή με ρήξη της κάψας ή με ασκίτη θετικό για κακοήθη κύτταρα ή θετικά περιτοναϊκά εκπλύματα
II	Ανάπτυξη του όγκου στη μια ή και τις δύο ωοθήκες με επέκταση στην πύελο
IIa	Επέκταση ή/και μετάσταση στη μήτρα και/ή τις σάλπιγγες
IIb	Επέκταση σε άλλα πυελικά όργανα
IIc	IIa ή IIb αλλά με παρουσία όγκου στην επιφάνεια της μιας ή και των δύο ωοθηκών ή με ρήξη της κάψας ή με ασκίτη θετικό για κακοήθη κύτταρα ή θετικά περιτοναϊκά εκπλύματα

III	Ανάπτυξη του όγκου στη μια ή και τις δύο ωθήκες με περιτοναϊκές εμφυτεύσεις εκτός πυέλου και/ή θετικούς πυελικούς ή παραορτικούς λεμφαδένες. Επιφανειακές εντοπίσεις ήπατος. Επίσης νόσος που περιορίζεται στην πύελο αλλά ιστολογικά τεκμηριώνεται επέκταση στο λεπτό έντερο ή το επίπλουν
IIIa	Όγκος αδρά περιοριζόμενος στην ελάσσονα πύελο με αρνητικούς λεμφαδένες αλλά με ιστολογικά επιβεβαιωμένη μικροσκοπική διασπορά σε περιτοναϊκές επιφάνειες
IIIb	Όγκος στη μία ή και τις δύο ωθήκες με ιστολογικά επιβεβαιωμένες μακροσκοπικές εμφυτεύσεις σε περιτοναϊκές επιφάνειες που καμία δεν υπερβαίνει τα 2 εκατοστά σε διάμετρο, με αρνητικούς λεμφαδένες
IIIc	Περιτοναϊκές εμφυτεύσεις μεγαλύτερες από 2 εκατοστά σε διάμετρο και/ή θετικοί πυελικοί ή παραορτικοί λεμφαδένες
IV	Όγκος στη μία ή και τις δύο ωθήκες με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αν υπάρχει πλευριτική συλλογή πρέπει να τεκμηριωθεί κυτταρολογικώς για να σταδιοποιηθεί ως στάδιο IV. Παρεγχυματική νόσος ήπατος

**Πίνακας 7.** Σταδιοποίηση καρκίνου ωθηκών

Η σημασία της αφαίρεσης πυελικών και παρα-αορτικών λεμφαδένων οφείλεται στο υψηλό ποσοστό διήθησης λεμφαδένων σε ασθενείς οι οποίοι φαινομενικά έχουν νόσο σταδίου I και II. Σε περίπτωση ωστόσο τοπικά προχωρημένης νόσου, η οπισθοπεριτοναϊκή λεμφαδενεκτομή δε πραγματοποιείται συνήθως (ως ρουτίνα) και το προγνωστικό της όφελος παραμένει αμφιλεγόμενο. Η σταδιοποίηση πρέπει να πραγματοποιείται από καλά εκπαιδευμένο χειρουργό με εμπειρία στο χειρισμό ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών. Η πλειοψηφία των γενικών χειρουργών δεν είναι εξοικειωμένη με την ανατομία της οπισθοπεριτοναϊκής περιοχής της πυέλου ειδικά γύρω από τα αγγεία. Τα δεδομένα δείχνουν πως μια χειρουργική σταδιοποίηση είναι πιο πιθανό να είναι πλήρης όταν διενεργηθεί από εξειδικευμένο στον καρκίνο γυναικολόγο παρά από γενικό χειρουργό.

Το αρχικό ογκομειωτικό χειρουργείο είναι βασική προσέγγιση στην αρχική αντιμετώπιση ασθενών με προχωρημένο επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Σε θεωρητική βάση υπάρχουν καλοί λόγοι να πιστέψουμε πως η ογκομείωση θα αυξήσει την επιβίωση, καθώς η μείωση του όγκου προ έναρξης χημειοθεραπείας μπορεί να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στις μεταστατικές εστίες, να μειώσει τον αριθμό των απαιτούμενων κύκλων χημειοθεραπείας προκειμένου να εξαλειφθούν οι υπολειπόμενες εστίες και άρα να καθυστερήσει την ανάπτυξη της επερχόμενης χημειοαντοχής.

Σε ανασκόπηση 81 μελετών που αφορούσαν σε 6.885 ασθενείς φάνηκε πως για κάθε αύξηση κατά 10% των ασθενών στους οποίους επιτυγχάνονταν η μέγιστη χειρουργική ογκομείωση, υπήρχε αύξηση της μέσης επιβίωσης αντίστοιχα κατά 5,5% (principles and practice of gynecologic oncology p283). Επιπλέον η πρόγνωση των ασθενών στους οποίους δεν επιτυγχάνεται η βέλτιστη ογκομείωση παραμένει φτωχή. Σε ασθενείς όπου η βέλτιστη ογκομείωση δεν είναι τεχνικά εφικτή εξαρχής, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ενδεχόμενο ενδιάμεσου ογκομειωτικού χειρουργείου. Πράγματι, σε προοπτική μελέτη της Gynecological Cancer Cooperative Group (GCG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) το 1995 φάνηκε πως το ενδιάμεσο ογκομειωτικό χειρουργείο αύξησε στατιστικά σημαντικά τόσο το PFS όσο και τη συνολική επιβίωση (73).

Περίπου το 15% των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών διαγιγνώσκονται με νόσο σταδίου IV. Η συνολική μέση επιβίωση ασθενών σταδίου IV είναι 15-23 μήνες με εκτιμώμενη 5 ετή επιβίωση 20%. Μια αναδρομική μελέτη 360 ασθενών με νόσο σταδίου IV που υποβλήθηκαν αρχικά σε χειρουργείο και έλαβαν στη συνέχεια χημειοθεραπεία (6 κύκλους ενδοφλέβιας χημειοθεραπείας με πλατινούχο σκεύασμα και ταξάνη), έδειξε πως ασθενείς με μικροσκοπική υπολειπόμενη νόσο μετά το χειρουργείο είχαν καλύτερη πρόγνωση, ενώ ασθενείς με υπολειπόμενη νόσο 0,1-1cm και αυτοί με 1-5cm είχαν παρόμοια PFS και OS)

## 1.5 Αντιμετώπιση - θεραπευτικό πλάνο

### 1.5.1 Χειρουργική αντιμετώπιση

#### 1.5.1.1 Χειρουργική αντιμετώπιση χαμηλού σταδίου πρωτοπαθούς νόσου (early primary disease)

Ο σκοπός του χειρουργείου σε χαμηλού σταδίου (early) καρκίνο των ωθηκών είναι η αφαίρεση του όγκου αφενός και η πραγματοποίηση επαρκούς σταδιοποίησης. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η απόκτηση προγνωστικών πληροφοριών, ικανών να καθορίσουν την αναγκαιότητα όποιας επικουρικής χημειοθεραπείας. Η διάγνωση μπορεί να έχει γίνει προεγχειρητικά, ενώ δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις όπου ο όγκος μπορεί να είναι τυχαίο εύρημα. Η ακριβής χειρουργική σταδιοποίηση είναι σημαντική όπως έχει ήδη προαναφερθεί, καθώς μπορεί να αποκαλύψει «κρυφή» (occult) προχωρημένη νόσο. Αναλόγως του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας και του ιστολογικού υπότυπου,  $\leq 30\%$  των ασθενών με εμφανώς χαμηλού σταδίου επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών, θα αλλάξουν στάδιο της νόσου (upstaged) μετά από ενδελεχή χειρουργική σταδιοποίηση. Σε μια μελέτη με 96 ασθενείς χωρίς μεγάλο φορτίο νόσου και με νόσο η οποία περιοριζόταν στη μια μόνο ωθήκη, φάνηκε πως σε 15% των ασθενών υπήρχε μικροσκοπική διήθηση των λεμφαδένων (74). Ανάμεσα σε αυτούς το 50% είχε θετικούς πυελικούς λεμφαδένες, το 36% είχε θετικούς παρα-αορτικούς και το 14% είχε και πυελικούς και παρα-αορτικούς θετικούς. Όλοι οι ασθενείς είχαν νόσο υψηλού βαθμού κακοήθειας (grade 3).

Σε μια προοπτική τυχαίοποιημένη μελέτη με πλήρη-συστηματική λεμφαδενεκτομή, σε ασθενείς με νόσο η οποία μακροσκοπικά περιοριζόταν στην πύελο, διαπιστώθηκαν θετικοί λεμφαδένες στο 22% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε συστηματική λεμφαδενεκτομή σε σχέση με το 9% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε δειγματοληπτική αφαίρεση λεμφαδένων (sampling) ( $P = 0.007$ ). Αν και παρατηρήθηκε μια τάση για βελτίωση του διαστήματος χωρίς εξέλιξη της νόσου (progression free survival - PFS) καθώς και της συνολικής επιβίωσης (overall survival - OS) στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε πλήρη λεμφαδενικό καθαρισμό σε σχέση με τους ασθενείς με δειγματοληπτική αφαίρεση λεμφαδένων, η μελέτη δεν είχε τη στατιστική ισχύ για να οδηγήσει σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα (75). Επομένως στην παρούσα φάση δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία που να υποστηρίζουν πως ο πλήρης λεμφαδενικός καθαρισμός από μόνος του, επηρεάζει την επιβίωση. Μεγάλοι λεμφαδένες (bulky)

πρέπει να αφαιρούνται σε μια προσπάθεια να αφαιρεθεί όλη η μακροσκοπικά εμφανής υπολειπόμενη νόσος. Επαρκές χειρουργείο, χωρίς διατήρηση της γονιμότητας, περιλαμβάνει τη λήψη περιτοναϊκών εκπλυμάτων, τα οποία ιδανικά συλλέγονται πριν από τους χειρισμούς στον όγκο, αμφοτερόπλευρη σαλπινγγο-ωοφορεκτομή, υστερεκτομή, πολλαπλές περιτοναϊκές βιοψίες από όλα τα κοιλιακά πεδία, επιπλεκτομή, αφαίρεση της σκωληκοειδούς απόφυσης (ειδικά αν πρόκειται για βλεννώδη ιστολογικό τύπο) καθώς και λεμφαδενεκτομή παρα-αορτικών και πυελικών λεμφαδένων ως το ύψος των νεφρικών αγγείων.

Σε περίπτωση που η νόσος αφορά σε νέες γυναίκες και νόσο χαμηλού σταδίου, μπορεί να διενεργηθεί χειρουργείο διατήρησης γονιμότητας, μετά από ενημέρωση της ασθενούς για όποιους ενδεχόμενους κινδύνους κρύβονται πίσω από αυτή τη θεραπευτική επιλογή. Ασθενείς με στάδιο Ia ή Ic με ετερόπλευρη εντόπιση στη μια μόνο ωοθήκη, καλό ιστολογικό τύπο δηλαδή βλεννώδες, ορώδες, ενδομητριοειδές ή μεικτού ιστολογικού τύπου και βαθμού κακοήθειας grade 1 ή 2 θα μπορούσαν δυνητικά να υποβληθούν σε χειρουργείο διατήρησης γονιμότητας σε συνδυασμό μόνο με πλήρη χειρουργική σταδιοποίηση. Αυτό θα περιλάμβανε λεμφαδενικό καθαρισμό προκειμένου να αποκλεισθεί προχωρημένη νόσος. Σε μεγάλες αναδρομικές μελέτες έχει φανεί πως ασθενείς με G3 νόσο ή στάδιο Ic με διαυγοκυτταρικό ιστολογικό τύπο, έχουν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής. Ωστόσο, αυτός ο αυξημένος κίνδυνος αποδίδεται κατά κύριο λόγο στη μεγαλύτερη πιθανότητα εξω-ωοθηκικής διασποράς της νόσου που παρατηρείται σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας (G3) παρά σε υψηλότερη συχνότητα υποτροπής στη διατηρημένη ωοθήκη (76). Επομένως οι ασθενείς αυτές πρέπει να ενημερώνονται προσεκτικά για την πρόγνωση τους προκειμένου να κάνουν μια σοβαρή προσωπική επιλογή.

#### *1.5.1.2 Χειρουργική αντιμετώπιση πρωτοπαθούς τοπικά προχωρημένου καρκίνου των ωοθηκών (primary advanced ovarian cancer)*

Στον τοπικά προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών, ο σκοπός είναι η πλήρης ογκομείωση της μακροσκοπικά ορατής νόσου, καθώς αυτή η πρακτική έχει δείξει να συσχετίζεται με σημαντική αύξηση της συνολικής επιβίωσης αλλά και του διαστήματος χωρίς εξέλιξη της νόσου (OS και PFS αντίστοιχα) (77). Προκειμένου να γίνει αυτό εφικτό απαιτείται μέγιστη χειρουργική προσπάθεια η οποία θα περιλαμβάνει αφαίρεση τμήματος του εντέρου, ενδελεχή έλεγχο της περιτοναϊκής

κοιλότητας (peritoneal stripping), εκτομή του διαφράγματος, αφαίρεση μεγάλων παρα-αορτικών λεμφαδένων και σπληνεκτομή. Συνεχώς αυξάνονται τα στοιχεία που υποστηρίζουν πως η εμπειρία και η εξειδίκευση του χειρουργού οδηγούν στη βέλτιστη ογκομείωση χωρίς παράλληλα να αυξάνεται η νοσηρότητα ως συνέπεια αυτής της πρακτικής (78). Επομένως σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένη νόσο συστήνεται η πραγματοποίηση χειρουργικής επέμβασης σε εξειδικευμένα κέντρα, με χειρουργούς εξοικειωμένους με την ανατομία της οπισθοπεριτοναϊκής περιοχής της πυέλου, ειδικά με την περιοχή εκείνη γύρω από τα αγγεία. Ως βέλτιστη ογκομείωση ορίζεται η ολική μακροσκοπική αφαίρεση του όγκου χωρίς υπολειπόμενη ορατή νόσο. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση όπου αξιολογούταν το χειρουργικό αποτέλεσμα σε περισσότερες από 3120 ασθενείς έδειξε πως ο υπολειπόμενος όγκος είναι πιο ισχυρός προγνωστικός παράγοντας από το στάδιο κατά FIGO (ασθενείς σταδίου IIb-IIIb κατά FIGO στις οποίες δεν είχε επιτευχθεί η βέλτιστη ογκομείωση είχαν χειρότερη πρόγνωση από ασθενείς σταδίου IIIc στις οποίες είχε επιτευχθεί η μέγιστη ογκομείωση) (77). Η σημασία της συστηματικής λεμφαδενεκτομής πυελικών και παρα-αορτικών λεμφαδένων σε τοπικά προχωρημένη νόσο παραμένει αμφιλεγόμενη. Μια αναδρομική ανάλυση σε περισσότερες από 1900 ασθενείς έδειξε πως η λεμφαδενεκτομή σχετιζόταν με παράταση της επιβίωσης σε ασθενείς χωρίς μεγάλη υπολειπόμενη νόσο (79). Ωστόσο, προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη έδειξε πως η λεμφαδενεκτομή σε σύγκριση με αφαίρεση μόνο μεγάλων διηθημένων λεμφαδένων σε ασθενείς με υπολειπόμενη νόσο <2 cm αύξησε το PFS όχι όμως και τη συνολική επιβίωση (80). Μια μεγάλη πολυκεντρική προοπτική μελέτη όπου εξετάζονται τα αποτελέσματα της πλήρους λεμφαδενεκτομής (LIONTrial) κατέληξε πως σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, που υποβλήθηκαν σε πλήρες χειρουργείο με επίτευξη μέγιστης ογκομείωσης, χωρίς προσβεβλημένους λεμφαδένες τόσο από προεγχειρητικά δεδομένα όσο και από διεγχειρητικά, η συστηματική πυελική και οπισθοπεριτοναϊκή λεμφαδενεκτομή δεν αύξησε ούτε το PFS, ούτε το OS, παρά μόνο τις μετεγχειρητικές επιπλοκές (81). Στην παρούσα φάση λοιπόν η συστηματική λεμφαδενεκτομή δεν πρέπει να θεωρείται καθιερωμένη διαδικασία, εφόσον δεν υπάρχουν προεγχειρητικά στοιχεία διήθησης και επέκτασης νόσου σε λεμφαδένες. Έτσι, επί του παρόντος η αφαίρεση μεγάλων διηθημένων λεμφαδένων πραγματοποιείται στο πλαίσιο της προσπάθειας επίτευξης μέγιστης ογκομείωσης. Ο συγχρονισμός της χειρουργικής ογκομείωσης και της

χημειοθεραπείας είναι επίσης ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα. Μεγάλη προοπτική μελέτη (82) έδειξε πως σε τοπικά προχωρημένη νόσο σταδίου IIIc και IV, τρεις κύκλοι εισαγωγικής χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα ακολουθούμενοι από ενδιάμεσο ογκομειωτικό χειρουργείο, δεν ήταν κατώτεροι σε σύγκριση με εξαρχής ογκομειωτικό χειρουργείο ακολουθούμενο από επικουρική χημειοθεραπεία. Η χειρουργική νοσηρότητα είχε διαφορά, όχι όμως στατιστικά σημαντική, στις δυο ομάδες με τάση να είναι μικρότερη στην ομάδα που έλαβε εισαγωγική χημειοθεραπεία. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω δεδομένων, η χορήγηση εισαγωγικής χημειοθεραπείας με ενδιάμεσα διενέργεια χειρουργείου, είναι πιο ευρέως αποδεκτή και εφαρμόζεται σε ασθενείς σε κακή λειτουργική κατάσταση κατά την εμφάνιση της νόσου, χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης και σε ασθενείς με μεγάλο φορτίο νόσου. Ο ρόλος δεύτερου ογκομειωτικού χειρουργείου, μετά από αρχική μη βέλτιστη ογκομείωση ακολουθούμενη από τρεις κύκλους χημειοθεραπείας, είναι λιγότερο σαφής. Βελτίωση της επιβίωσης μετά από δεύτερο χειρουργείο φάνηκε σε μελέτη (73) που διενεργήθηκε από την European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) αλλά δεν επιβεβαιώθηκε από άλλη μελέτη που διενεργήθηκε από Gynaecological Oncology Group (GOG) (83). Μια «second look» διαγνωστική είτε λαπαροσκόπηση είτε λαπαροτομία προκειμένου να εκτιμηθεί η ενδοπεριτοναϊκή κατάσταση μετά το πέρας της θεραπείας, είναι απαρχαιωμένη και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται καθώς ποτέ δεν έχει δείξει όφελος στην επιβίωση.

#### *1.5.1.3 Χειρουργική αντιμετώπιση υποτροπιάζοντος καρκίνου ωοθηκών και παρηγορητικό χειρουργείο*

Η αξία του ογκομειωτικού χειρουργείου σε υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών είναι αμφιλεγόμενη και δεν θεωρείται δεδομένη πρακτική (standard of care), καθώς δεν έχει δείξει όφελος σε προοπτικές μελέτες. Σε αναδρομικές αναλύσεις, φαίνεται πως το χειρουργείο στην πρώτη υποτροπή σχετίζεται με όφελος επιβίωσης εφόσον μπορεί να επιτευχθεί πλήρης αφαίρεση του όγκου (84). Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο στην υποτροπή, με τουλάχιστον δύο από τα ακόλουθα κριτήρια: πλήρη εκτομή του όγκου κατά το αρχικό χειρουργείο, καλή λειτουργική κατάσταση, απουσία ασκτικής συλλογής στην υποτροπή, είχαν την καλύτερη επιβίωση. Υπάρχουν στην παρούσα φάση δυο πολυκεντρικές προοπτικές τυχαίοποιημένες μελέτες όπου αξιολογείται ο ρόλος του χειρουργείου



στην υποτροπή. Η ευρωπαϊκή μελέτη, η DESKTOP III (NCT01166737) έχει κριτήρια ένταξης αντίστοιχα με τα παραπάνω, και όπως φαίνεται από τα πρώτα στοιχεία αναμένοντας τα δεδομένα συνολικής επιβίωσης, το χειρουργείο στην 1<sup>η</sup> υποτροπή μπορεί να αποτελεί επιλογή, σε επιλεγμένο πληθυσμό, με διάστημα από την τελευταία θεραπεία με βάση την πλατίνα >6μήνες, καθώς και PS=0, ασκτική συλλογή <500ml και πλήρη ογκομείωση στο αρχικό χειρουργείο (AGO-score) (85). Η άλλη μελέτη GOG 213 συμπεριλαμβάνει και θεραπεία με bevacizumab στη χημειοθεραπεία και δεν καταδεικνύει όφελος επιβίωσης (86). Ο ρόλος δε του χειρουργείου στις επόμενες υποτροπές ως παρηγορική αντιμετώπιση είναι ακόμα πιο ασαφής. Η μεγαλύτερη πολυκεντρική αναδρομική μελέτη του ογκομειωτικού χειρουργείου ως 3<sup>ης</sup> γραμμής αντιμετώπιση, περιλαμβάνει 400 ασθενείς σε 14 κέντρα παγκοσμίως (87). Η μελέτη αυτή έδειξε πως το μέγεθος του υπολειπόμενου όγκου έχει, ακόμα και στην 3<sup>η</sup> γραμμή αντιμετώπισης του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών, θετική επίδραση στην επιβίωση, υποσκελίζοντας τη σημασία άλλων γνωστών, καλά μελετημένων αρνητικών προγνωστικών παραγόντων επιβίωσης όπως της ασκτικής συλλογής, του προχωρημένου σταδίου κατά FIGO και της περιτοναϊκής καρκινωμάτωσης.

### 1.5.2 Χημειοθεραπεία

#### 1.5.2.1 Επικουρική χημειοθεραπεία για χαμηλού σταδίου νόσου (*early stage disease*)

Σε μετα-ανάλυση της Cochrane πέντε (5) μεγάλων προοπτικών κλινικών μελετών (4 στις 10 με χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα) έδειξαν πως η χημειοθεραπεία είναι πιο ωφέλιμη από την παρακολούθηση σε ασθενείς με χαμηλού σταδίου καρκίνο των ωοθηκών (88). Ασθενείς που έλαβαν επικουρική χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα, είχαν καλύτερη συνολική επιβίωση OS (σχετικός κίνδυνος (HR) 0.71; 95% confidence interval (CI) 0.53–0.93) και PFS (HR 0.67; 95% CI 0.53–0.84) σε σχέση με ασθενείς που δεν έλαβαν επικουρική χημειοθεραπεία. Αν και τα δυο τρίτα (2/3) των ασθενών στις δυο (2) μεγαλύτερες μελέτες ήταν υποσταδιοποιημένα (suboptimally), ακόμα και ασθενείς καλά σταδιοποιημένες ωφελήθηκαν. Η μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών της ICON 1 μελέτης επιβεβαίωσε το όφελος από τη χορήγηση της επικουρικής χημειοθεραπείας, ειδικά στις ασθενείς εκείνες με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής (σταδίου Ib/c grade 2/3, νόσο όποιου σταδίου εφόσον είναι grade 3 ή

διαυγοκυτταρικού τύπου ιστολογία) (89). Επομένως, η επικουρική χημειοθεραπεία πρέπει να δίνεται τόσο σε υποσταδιοποιημένες ασθενείς όσο και σε καλά σταδιοποιημένες ασθενείς με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής.

Ωστόσο, η βέλτιστη διάρκεια θεραπείας παραμένει αμφιλεγόμενο θέμα. Υπήρξε μόνο μια τυχαιοποιημένη μελέτη (GOG 157), η οποία έδειξε πως έξι κύκλοι χημειοθεραπείας με carboplatin και paclitaxel δε σχετίστηκαν με καλύτερο PFS ή OS αλλά με μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με τρεις (3) κύκλους χημειοθεραπείας (90). Δεν υπάρχουν δεδομένα να υποστηρίξουν πως η προσθήκη paclitaxel στη carboplatin υπερέχει έναντι της carboplatin μόνη της. Κάποιοι θεωρούν πως ο διαχωρισμός των ασθενών σε δυο (2) κατηγορίες ανάλογα με το στάδιο κατά FIGO σε Ic και στάδιο II–IV είναι λανθασμένος-πλασματικός, και διαλέγουν συνδυασμένη χημειοθεραπεία για ασθενείς σταδίου Ic. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν το όφελος της συνδυασμένης χημειοθεραπείας σε αυτές τις ασθενείς, οπότε η χορήγηση μονοθεραπείας με carboplatin σε όλες τις ασθενείς με ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου νόσο σταδίου I θεωρείται δικαιολογημένη επιλογή.

#### *1.5.2.2 Πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία για επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών σταδίου κατά FIGO II–IV*

Ο κίνδυνος υποτροπής της νόσου που επεκτείνεται πέρα από τις ωοθήκες, είναι σημαντικός, με αποτέλεσμα να θεωρείται σκόπιμη η χορήγηση μετεγχειρητικής επικουρικής χημειοθεραπείας σε όλες τις ασθενείς σταδίου II–IV κατά FIGO. Η συνήθης χημειοθεραπεία που χρησιμοποιείται είναι ο συνδυασμός paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> and carboplatin AUC 6 με τα δύο φάρμακα χορηγούμενα ενδοφλεβίως κάθε τρεις (3) εβδομάδες (91). Αυτός ο συνδυασμός αποτελεί τη βασική (standard) χημειοθεραπεία για πάνω από 15 χρόνια, ενώ κλινικές μελέτες της τελευταίας δεκαετίας όπου προστέθηκε και τρίτο φάρμακο, όπως η μεγάλη από τη Gynaecologic Cancer Inter Group (GCIG) ICON-5/GOG 182 μελέτη (92), δεν έδειξαν όφελος ούτε στο PFS ούτε στην OS στις ασθενείς που έλαβαν και το τρίτο φάρμακο (bevacizumab). Ο συνδυασμός επίσης cisplatin και paclitaxel είναι το ίδιο αποτελεσματικός, αλλά περισσότερο τοξικός και λιγότερο βολικός στη χορήγηση. Συνήθως χορηγούνται έξι (6) κύκλοι χημειοθεραπείας, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα να υποστηρίξουν πως περισσότεροι κύκλοι χημειοθεραπείας σχετίζονται με καλύτερο αποτέλεσμα.

Για τις ασθενείς που εμφανίζουν αλλεργία ή δεν ανέχονται καλά την paclitaxel, ο συνδυασμός docetaxel-carboplatin ή pegylated liposomal doxorubicin (PLD)-carboplatin μπορεί να θεωρηθούν ως εναλλακτικές, βάσει δυο (2) τυχαιοποιημένων μελετών όπου έδωσαν παρόμοια αποτελεσματικότητα (93)(94). Εναλλακτικά σχήματα χορήγησης paclitaxel και χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα συμπεριλαμβάνουν την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση και σχήματα εντατικοποιημένης δόσης (dose-dense). Η ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία έχει τέτοιο φαρμακοκινητικό υπόβαθρο ώστε να χορηγείται μέρος της χημειοθεραπείας (και ειδικά το πλατινούχο σκεύασμα) μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα μέσω καθετήρα. Μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη από τη GOG (GOG-172) έδειξε όφελος τόσο στο PFS όσο και στο OS μετά τη χορήγηση σχήματος που περιλάμβανε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση cisplatin τη 2<sup>η</sup> μέρα, ενδοφλέβια χορήγηση paclitaxel την 1<sup>η</sup> ημέρα, αλλά και ενδοπεριτοναϊκή έγχυση paclitaxel την 8<sup>η</sup> ημέρα (95). Το όφελος επιβίωσης από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση χημειοθεραπείας επιβεβαιώθηκε και από μετα-ανάλυση 5 κλινικών μελετών (96). Βάσει των παραπάνω δεδομένων η ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία, θεωρείται επιλογή σε ασθενείς με μικρό υπολειπόμενο (<1 cm) ή καθόλου υπολειπόμενο όγκο μετά το χειρουργείο. Ωστόσο αυτή η θεραπεία δεν θεωρείται βασική στις περισσότερες χώρες λόγω της μεγαλύτερης τοξικότητας και στη δυσκολία χορήγηση ολοκληρωμένης προσχεδιασμένης χημειοθεραπείας. Η απουσία από τις προηγούμενες μελέτες, σκέλους σύγκρισης με τη standard ενδοφλέβια χημειοθεραπεία, δημιουργεί περαιτέρω σκεπτικισμό και πολλοί κλινικοί θεωρούν ακόμα την ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία ως πειραματική στο πλαίσιο τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών πολλές από τις οποίες βρίσκονται σε εξέλιξη. Εντατικοποιημένο σχήμα χορήγησης, προκειμένου να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της paclitaxel, έχει επίσης δοκιμαστεί στον καρκίνο των ωοθηκών. Μια ιαπωνική μελέτη (NOVEL-JGOG 3062) συνέκρινε 3βδόμαδο σχήμα paclitaxel και carboplatin με την ίδια δόση carboplatin (AUC 6) κάθε τρεις (3) εβδομάδες και paclitaxel χορηγούμενη εβδομαδιαία σε δόση 80 mg/m<sup>2</sup>. Σημαντικά οφέλη τόσο σε PFS όσο και σε OS έχουν φανεί στα τρία (3) χρόνια, ενώ πρόσφατη επανεκτίμηση με μεγαλύτερη παρακολούθηση, επιβεβαίωσε το όφελος σε γυναίκες με μικρό όγκο και υπολειπόμενη μάζα >2 cm (97)(98). Ωστόσο το 36% των ασθενών σταμάτησε πρόωρα τη χημειοθεραπεία λόγω παρενεργειών και κυρίως μυελοτοξικότητας. Αυτή ενδεχομένως η μελέτη θα μπορούσε να

αποτελέσει μελέτη αλλαγής πρακτικής, αλλά υπάρχει η πιθανότητα αυτό το όφελος να αποτελεί τυχαίο γεγονός λόγω διαφορών φαρμακογενετικής ανάμεσα σε Γιαπωνέζους και Καυκάσιους, οπότε τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιωθούν με περαιτέρω κλινικές μελέτες σε Καυκάσιους. Η μελέτη της GOG 262 η οποία σύγκρινε αντίστοιχα την εβδομαδιαία έναντι της 3βδόμαδης paclitaxel δεν κατάφερε τελικά να επιδείξει διαφορά στο PFS, ενώ αντίστοιχα αναμένονται τα αποτελέσματα της ICON 8 (99) (NCT01654146). Ελλείπει επιβεβαιωτικών δεδομένων, η εντατικοποιημένη χορήγηση paclitaxel μπορεί να θεωρηθεί μια επιλογή, όχι όμως δεδομένη θεραπευτική επιλογή.

### 1.5.2.3 Στοχεύουσα θεραπεία

Η αγγειογένεση όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα και στο επόμενο τμήμα είναι βασικό στοιχείο της ογκογένεσης του καρκίνου ωοθηκών. Δυο (2) μεγάλες τυχαίοποιημένες μελέτες (GOG-218 και ICON-7) εξέτασαν την προσθήκη bevacizumab στο συνδυασμό paclitaxel και carboplatin στην πρώτη γραμμή θεραπείας (100)(101). Το bevacizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει το VEGF (vascular endothelial growth factor). Και στις δυο (2) μελέτες οι ασθενείς στο πειραματικό σκέλος έλαβαν bevacizumab ενδοφλεβίως κάθε τρεις (3) εβδομάδες κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας ακολουθούμενη από μια περίοδο συντήρησης με το ίδιο δοσολογικό σχήμα bevacizumab. Στη GOG-218 συμπεριλήφθηκε ένα δεύτερο πειραματικό σκέλος με bevacizumab με χημειοθεραπεία, ακολουθούμενη από συντήρηση με placebo. Υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις δύο (2) μελέτες, στις χορηγούμενες δόσεις (7.5 mg/kg στην ICON-7 έναντι 15 mg/kg στη GOG-218), στη διάρκεια χορήγησης (12 μήνες στην ICON-7 έναντι 15 μηνών στη GOG-218) και στα χαρακτηριστικά των ασθενών (η GOG-218 συμπεριλάμβανε μόνο ασθενείς σταδίου III–IV και μακροσκοπικά εμφανή υπολειπόμενη νόσο μετά από το χειρουργείο, ενώ η ICON-7 συμπεριλάμβανε επίσης ασθενείς υψηλού κινδύνου-χαμηλού σταδίου-high-risk early stage-και ασθενείς με πιο προχωρημένο στάδιο αλλά χωρίς εμφανή μακροσκοπικά υπολειπόμενη νόσο μετά από χειρουργείο). Και οι δύο (2) μελέτες πέτυχαν το πρωτεύον καταληκτικό τους σημείο, το οποίο ήταν το PFS για τα δυο (2) σκέλη με συντήρηση με bevacizumab. Στην ICON-7 μεγαλύτερο όφελος παρατηρήθηκε στον πληθυσμό υψηλού κινδύνου, δηλαδή στις ασθενείς με νόσο σταδίου III–IV και υπολειπόμενη νόσο >1 cm. Σε ενδιάμεση ανάλυση η συνολική

επιβίωση αυξήθηκε σε αυτή την ομάδα ασθενών. Στη GOG-218 δεν παρατηρήθηκε όφελος επιβίωσης, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα πιο ώριμα δεδομένα από την ICON-7 (102). Το bevacizumab έχει πάρει έγκριση από τον EMA (European Medicines Agency) στα 15 mg/kg, με carboplatin και paclitaxel για διάστημα  $\leq 15$  μηνών ή μέχρι πρόοδο νόσου. Μερικοί κλινικοί περιορίζουν τη χρήση του σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, με χαρακτηριστικά παρόμοια με τους ασθενείς της ICON-7, ενώ άλλοι χρησιμοποιούν το φάρμακο στην εγκεκριμένη του δόση βάσει ενδείξεως ή σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο. Η προσθήκη bevacizumab συνίσταται σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών με φτωχούς προγνωστικούς παράγοντες όπως είναι οι ασθενείς σταδίου IV ή οι ασθενείς στους οποίους δεν έχει επιτευχθεί η βέλτιστη κυτταρομείωση όπως ορίζονται στην ICON-7. Το bevacizumab πρέπει να χορηγείται σε συνδυασμό με paclitaxel ή carboplatin με διάρκεια θεραπείας ένα (1) χρόνο. Μελέτες με άλλους αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες και παρατεινόμενη χορήγηση είναι σε εξέλιξη.

#### *1.5.2.4 Αξιολόγηση της απάντησης στη χημειοθεραπεία*

Καθώς το CA 125 είναι αυξημένο στους περισσότερους ασθενείς με προχωρημένη νόσο, οι διαδοχικές μετρήσεις του είναι ένας χρήσιμος δείκτης εκτίμησης της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (εφόσον βέβαια η νόσος αυτή παράγει CA 125 και ο τελευταίος είναι αντιπροσωπευτικός αντίστοιχα του φορτίου της νόσου). Όπου υπάρχει ορατή νόσος σε αξονική τομογραφία κατά την έναρξη της χημειοθεραπείας, μπορεί να αξιολογηθεί μετά από τη χορήγηση κάποιων σχημάτων (συνήθως μετά από χορήγηση των μισών από τους προγραμματισμένους αρχικά κύκλους). Αξονική πρέπει να διενεργείται πριν από ενδιάμεσο ογκομειωτικό χειρουργείο ή στο τέλος της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκταση της νόσου. Εάν το CA 125 δεν φτάσει σε φυσιολογικά επίπεδα πριν από το τέλος της χημειοθεραπείας ή εάν υπάρχει υπολειπόμενη νόσος στις αξονικές, η έκταση-κατάσταση της νόσου θα θεωρηθεί ως μερική ανταπόκριση (PR partial response) στην πρώτη γραμμής χημειοθεραπείας.

#### 1.5.2.5 Χημειοθεραπεία σε υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών

Παρά τη βέλτιστη χειρουργική ογκομείωση και τη χορήγηση πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία με paclitaxel-carboplatin, ~70% των ασθενών θα υποτροπιάσουν μέσα στα τρία (3) πρώτα χρόνια. Η πρόγνωση και η πιθανότητα απάντησης σε δεύτερης γραμμής χημειοθεραπεία και σε επόμενες γραμμές χημειοθεραπείας εξαρτάται κυρίως από το διάστημα ελεύθερο νόσου (progression-free interval) μετά από την τελευταία δόση της προηγούμενης χημειοθεραπείας. Η συνθήκη αυτή αφορά κυρίως την απάντηση σε επαναχορήγηση πλατινούχου σκευάσματος, αλλά πιθανότατα βρίσκει εφαρμογή και σε θεραπείες με μη πλατινούχα σκευάσματα.

Μια κατηγοριοποίηση πρόσφατα ενημερωμένη (GCIG 4<sup>th</sup> Ovarian Cancer Consensus Meeting) ορίζει ως πλατινο-άντοχη (platinum-refractory) τη νόσο, η οποία εξελίσσεται υπό χημειοθεραπεία με πλατίνα ή μέσα σε τέσσερις (4) εβδομάδες μετά από την τελευταία δόση, πλατινο- ανθεκτική (platinum-resistant) νόσο που εξελίσσεται μέσα σε έξι (6) μήνες μετά από χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα, μερικώς πλατινο-ευαίσθητη (partially platinum-sensitive) τη νόσο αυτή που εξελίσσεται μέσα σε 6-12 μήνες και πλατινοευαίσθητη (platinum-sensitive) τη νόσο που εξελίσσεται σε διάστημα μεγαλύτερο των 12 μηνών (103). Πρέπει να σημειωθεί πως αυτή η κατηγοριοποίηση στηρίζεται σε μελέτες παρατήρησης και είναι «προπαμπιστική» (probabilistic), με την πιθανότητα-παραδοχή πως η απάντηση είναι συνεχής μεταβλητή. Επιπλέον ο όρος πλατινο-άντοχη και πλατινο-ανθεκτική αναφέρεται σε νόσο η οποία έχει υποτροπιάσει μετά από μια ή πολλές γραμμές χημειοθεραπείας. Η βιολογική συμπεριφορά του όγκου σε αυτές τις κατηγορίες ποικίλλει με διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης και διαφορετικά συμπτώματα, απαιτώντας πιθανότατα διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση. Η θεραπεία ασθενών με πλατινο-ανθεκτική και πλατινο-άντοχη νόσο πρέπει να εστιάζεται στην ποιότητα ζωής και στον έλεγχο των συμπτωμάτων της νόσου. Οι ασθενείς οι οποίες ανήκουν σε αυτό τον πληθυσμό, έχουν φτωχή πρόγνωση και μικρή αναμενόμενη συνολική επιβίωση (OS συνήθως <12 μηνών). Τέσσερα διαφορετικά σκευάσματα, εβδομαδιαία ή 3βδόμαδη paclitaxel, topotecan, λιποσωμιακή δοξουβικίνη PLD και gemcitabine έχουν δείξει αποτελεσματικότητα σε μελέτες φάσης III, με συνολική ανταπόκριση (response rates) όχι >15% και διάμεσο PFS 3–4 μηνών. Περιστασιακά, πλατινούχα σκευάσματα συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται και σε νόσο πλατινο-ανθεκτική σε

εντατικοποιημένα σχήματα δόσεων. Ωστόσο, καθώς κανένα φάρμακο δεν έχει αποδειχθεί να υπερέχει του άλλου, η επιλογή της θεραπείας πρέπει να στηρίζεται στο προφίλ τοξικότητας, στην κλινική κατάσταση του ασθενούς και την ευκολία στη χορήγηση του σκευάσματος. Τυχαίοποιημένες μελέτες συνδυαστικής χημειοθεραπείας δεν έδειξαν όφελος σε αυτό τον πληθυσμό, παρά μόνο αυξημένη τοξικότητα. Αντίθετα, η διαδοχική μονοθεραπεία είναι η συνιστώμενη προσέγγιση για αυτές τις ασθενείς. Για τις ασθενείς με υποτροπή σε διάστημα μεγαλύτερο των έξι (6) μηνών και ειδικότερα σε διάστημα μεγαλύτερο των δώδεκα (12) μηνών, διπλέτα χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων με βάση την carboplatin είναι η θεραπεία εκλογής. Σε μελέτες που αφορούσαν την τελευταία υποομάδα ασθενών, όπου συγκρίθηκε η χορήγηση της carboplatin ως μονοθεραπεία σε σύγκριση με συνδυασμό carboplatin μαζί με paclitaxel, gemcitabine ή ανθρακυκλίνη, φάνηκε βελτίωση του PFS με όλους τους συνδυασμούς. Ωστόσο, όφελος επιβίωσης φάνηκε μόνο στο συνδυασμό carboplatin-paclitaxel (ICON 4/OVAR 2.2) (104). Επιπλέον η μελέτη CALYPSO έδειξε πως ο συνδυασμός carboplatin-PLD (λιποσωμιακή δοξορουβικίνη) δεν ήταν κατώτερος του συνδυασμού paclitaxel-carboplatin σε ό,τι αφορά το PFS, ωστόσο ήταν πιο καλά ανεκτός λόγω μικρής επίπτωσης αλωπεκίας, νευροπάθειας, αρθραλγιών και λιγότερων αντιδράσεων υπερευαισθησίας (105). Επομένως, η επιλογή μεταξύ των διαφορετικών συνδυασμών με πλατινούχο σκεύασμα πρέπει να βασίζεται στο προφίλ τοξικότητας και στην ευκολία χορήγησης. Πολλές θεραπευτικές επιλογές υπάρχουν για τις ασθενείς με «πλατινοευαίσθητη» υποτροπή, οπότε και μπορούν να επιλεγθούν διαφορετικοί συνδυασμοί, οι περισσότεροι από τους οποίους περιλαμβάνουν την πλατίνα, ωστόσο στην υποομάδα της μερικής πλατινοευαισθησίας, όφελος επιβίωσης φάνηκε στη μελέτη OVA-301 με το συνδυασμό trabectedin και PLD έναντι της μονοθεραπείας με PLD (106). Έχει προταθεί, ως εξήγηση αυτού του οφέλους, η «επαναφορά» της πλατινοευαισθησίας από την πλασματική παράταση του διαστήματος εκτός πλατίνας (platinum free Interval). Η παραπάνω υπόθεση ερευνάται σε δυο προοπτικές τυχαίοποιημένες μελέτες που είναι σε εξέλιξη. Το bevacizumab έχει φανεί να βελτιώνει το PFS στον υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών σε δυο (2) τυχαίοποιημένες μελέτες φάσης III. Η πρώτη (OCEANS trial) περιλάμβανε ασθενείς με μετρήσιμη υποτροπιάζουσα νόσο μετά από πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία και διάστημα εκτός πλατίνας μεγαλύτερο από έξι (6) μήνες. Όλες οι ασθενείς έλαβαν συνδυασμό carboplatin και

gemcitabine σε συγκεκριμένη δόση και τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν bevacizumab (15 mg/kg) ή placebo κάθε 3 εβδομάδες μέχρι πρόοδου της νόσου. Η προσθήκη του bevacizumab στη χημειοθεραπεία αύξησε σημαντικά το PFS (HR 0.48, 95% CI 0.38–0.60) και προσέθεσε μια αύξηση του συνολικού ποσοστού ανταπόκρισης της τάξης του 21% (ORR 78.5% έναντι 57.4%,  $P < 0.0001$ ) (106). Πιο ώριμη-πρόσφατη ανάλυση επιβίωσης δεν έδωσε επιπλέον όφελος επιβίωσης, πιθανόν λόγω του μεγάλου ποσοστού crossover (41% των ασθενών στο σκέλος σύγκρισης πέρασαν στο σκέλος με το bevacizumab σε κάποια φάση προόδου της νόσου). Ωστόσο το bevacizumab σε συνδυασμό με αυτή τη χημειοθεραπεία πήρε έγκριση από τον EMA για χορήγηση σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα πλατινο-ευαίσθητο καρκίνο των ωοθηκών, οι οποίες δεν έχουν λάβει στο παρελθόν bevacizumab. Η δεύτερη μελέτη (AURELIA) αφορούσε ασθενείς με πλατινο-ανθεκτική νόσο. Πρόκειται για μια επιλεγμένη ομάδα ασθενών που δεν είχαν λάβει περισσότερες από δυο (2) προηγούμενες γραμμές θεραπείας, δεν είχαν αποδεδειγμένη απόφραξη εντέρου ή νόσο στον ορογόνο του ορθοσιγμοειδούς. Οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία βάσει της επιλογής του θεράποντος (εβδομαδιαία paclitaxel, PLD ή torotecan) και τυχαιοποιήθηκαν στη λήψη bevacizumab ή όχι άλλης πρόσθετης θεραπείας, και στη συνέχεια έλαβαν bevacizumab ως συντήρηση μέχρι πρόοδου νόσου. Οι ασθενείς που έλαβαν bevacizumab είχαν μεγαλύτερο PFS (HR 0.48, 95% CI 0.38–0.60) και αύξηση του ποσοστού ανταπόκρισης υπολογιζόμενου βάσει των κριτηρίων RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) περίπου 15% (11.8% έναντι 27.3%) (107). Ωστόσο εκκρεμούν ακόμα δεδομένα ποιότητας ζωής και συνολικής επιβίωσης.

### 1.6 Παρακολούθηση (follow-up)

Η υποτροπή μπορεί να καθοριστεί βάσει της τιμής-κριτήριο CA 125, ακόμα και αν αυτό δε μεταφράζεται πάντα σε αλλαγή της θεραπευτικής αντιμετώπισης. Συνήθως αύξηση του CA 125 απαιτεί περαιτέρω απεικονίσεις. Σύμφωνα λοιπόν με τα κριτήρια της GCIg, η πρόοδος νόσου ή υποτροπή που βασίζεται στη μέτρηση του CA 125 στον ορό του αίματος, ορίζεται βάσει σειράς διαδοχικά αυξανόμενων μετρήσεων του CA 125 στον ορό (108). Αυξημένες τιμές πρέπει να επιβεβαιωθούν σε δυο (2) διαδοχικές μετρήσεις με διαφορά στη λήψη μεταξύ τους τουλάχιστον μιας εβδομάδας. Η ημερομηνία της βιοχημικής υποτροπής θεωρείται η ημερομηνία



της πρώτης μέτρησης του CA 125 που πληρεί τα παραπάνω κριτήρια. Η αξία της παρακολούθησης μέσω μέτρησης του CA 125 μετά από πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία, δεν έχει αποδειχθεί (weak evidence) ως εκ τούτου η πρακτική κάθε θεράποντα διαφέρει. Κλινική εκτίμηση με ή χωρίς πνευλική εξέταση και μέτρηση στον ορό του CA125, πραγματοποιείται κάθε τρεις (3) μήνες για τα πρώτα δύο (2) χρόνια, κάθε έξι (6) μήνες για τα επόμενα τρία (3) χρόνια ή μέχρι πρόοδο νόσου. Ενώ η αξία της παρακολούθησης μέσω μέτρησης του CA 125 κατά τη διάρκεια της θεραπείας είναι σαφής, η αξία του στην παρακολούθηση μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας είναι λιγότερο σαφής. Μια φάσης III τυχαιοποιημένη μελέτη (OV05-EORTC 55955) στην οποία συγκρίνεται η άμεση έναρξη δεύτερης γραμμής χημειοθεραπεία βασισμένη στην αύξηση του CA 125, με τη θεραπεία που ξεκινά βασιζόμενη σε κλινική απόδειξη της υποτροπής της νόσου, δεν έδειξε κανένα όφελος επιβίωσης υπέρ της άμεσης επανέναρξης χημειοθεραπείας βάσει του CA 125. Η θεραπεία καθυστέρησε για περίπου 4.8 μήνες χωρίς αυτό να επηρεάσει σημαντικά τη συνολική επιβίωση (HR 1.01; 95% CI 0.82–1.25; P = 0.91) (109). Αντίστοιχα, η τρίτης γραμμής θεραπεία ξεκίνησε 4,6 μήνες νωρίτερα στις ασθενείς με συστηματική καταγραφή του CA 125, με έκπτωση τελικά στην ποιότητα ζωής των ασθενών που έλαβαν νωρίτερα χημειοθεραπεία. Ενώ ορισμένοι κλινικοί δεν μετρούν πλέον CA 125 στο πλαίσιο παρακολούθησης, άλλοι πάλι θεωρούν πως η μη μέτρηση του CA 125 μπορεί να γίνει η αιτία να χαθεί μια εξαιρετική χειρουργικά υποτροπή.

Τα αποτελέσματα μελετών που είναι σε εξέλιξη θα καθορίσουν αν το χειρουργείο στην υποτροπή θα βελτιώσει τη συνολική επιβίωση. Η καθημερινή πρακτική σε ότι αφορά την παρακολούθηση εξαρτάται από τις κατά τόπου πρακτικές και τις επιθυμίες των ασθενών, έτσι κάποιοι ασθενείς προτιμούν την εξασφάλιση της φυσιολογικής τιμής του CA125. Πολλοί κλινικοί έχουν μεταφράσει τα αποτελέσματα της OV05-EORTC 55955 ως ένδειξη πως είναι ασφαλές να καθυστερήσει η επανέναρξη χημειοθεραπείας μέχρι την εμφάνιση συμπτωμάτων παρά την αύξηση του CA 125, δεδομένου πως οι ασθενείς είναι σε καλή κατάσταση, το φορτίο της νόσου σε αξονική τομογραφία είναι μικρό και δεν υπάρχει ένδειξη οργανικής ανεπάρκειας.

Η απεικόνιση με PET-CT μπορεί να αναδείξει εστίες νόσου μη ορατές με απλή απεικόνιση με αξονική τομογραφία. Ο βασικός ρόλος αυτής της απεικόνισης είναι η εύκολη διαλογή ασθενών για δεύτερο ογκομειωτικό χειρουργείο

αποκλείοντας αυτές με πρόσθετες εστίες νόσου μη ορατές σε CT και όχι εξαιρέσιμες.

## *Κεφάλαιο 2: Το σύστημα NF-Kb/ NF-Kb targeted genes*

### *2.1 Ο Πυρηνικός Παράγοντας kB (NF-Kb) (Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells)*

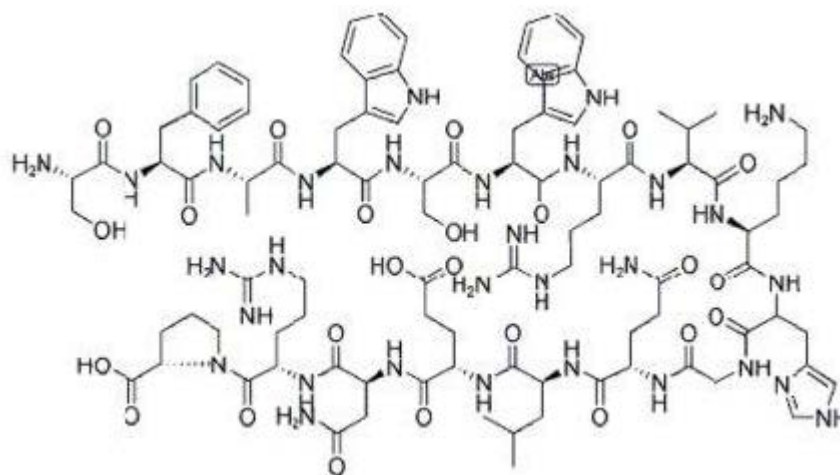
Ο NF-kB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο δεδομένου ότι ρυθμίζει την έκφραση για περισσότερα από 500 γονίδια που εμπλέκονται σε κρίσιμα μονοπάτια του κυττάρου, όπως αυτά που ελέγχουν την φλεγμονή, την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (110).

Η τεράστια σημασία του NF-kB και η εμπλοκή του σε όλες τις παραπάνω διαδικασίες αποδείχθηκε και με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε knock-out ποντίκια (111).

Ο NF-kB ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στα B λεμφοκύτταρα, ως ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία DNA 10 βάσεων (GGGACTTCC), στον ενισχυτή της ελαφριάς κ αλυσίδας των ώριμων B λεμφοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων, αλλά όχι στα ανώριμα B λεμφοκύτταρα (112).

Σήμερα είναι γνωστό ότι ο NF-kB εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους και ενεργοποιείται ως απόκριση σε πολλά ερεθίσματα, όπως κυτταροκίνες, μολυσματικούς παράγοντες, καθώς και ως απάντηση σε ποικίλες στρεσογόνες καταστάσεις όπως τραυματισμό που απαιτούν γρήγορο επαναπρογραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης (113).

Μη ελεγχόμενη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-Kb έχει δειχθεί με έρευνες να εμπλέκεται στη χρόνια φλεγμονή, στην αυτοανοσία, σε κληρονομικές ασθένειες και σε διάφορους τύπους καρκίνου (114). (Εικόνα 7)



**Εικόνα 7.** Δομή NF-κB και πως αναδιπλώνεται στο χώρο

Όταν αναφερόμαστε στο μεταγραφικό παράγοντα NF-κB δεν αναφερόμαστε σε μία μοναδική πρωτεΐνη, αλλά σε μια οικογένεια διμερών μεταγραφικών παραγόντων, που στα θηλαστικά αποτελείται από τις εξής πέντε (5) Rel πρωτεΐνες: RelA (p65), RelB, c- Rel, NF-κB1 (p105/p50) και NF-κB2 (p100/p52) (115)(116).

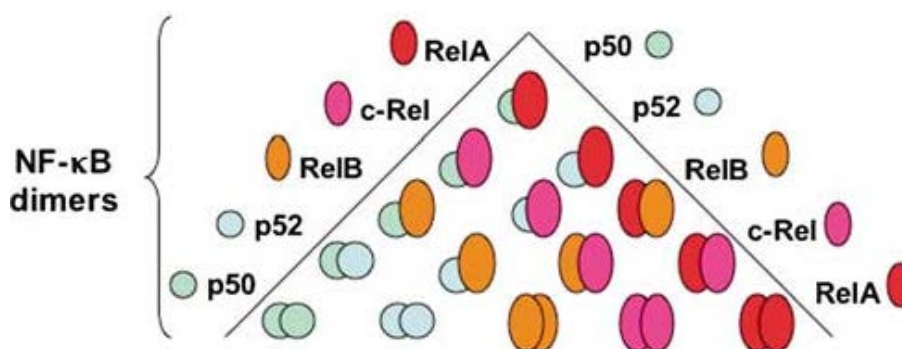
## 2.2 Οι πρωτεΐνες - μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB

ΤΑΞΗ	ΠΡΩΤΕΙΝΗ	ΑΛΛΑ ΟΝΟΜΑΤΑ	ΓΟΝΙΔΙΑ
I	NF-Kb1	p105 → p50	NFKB1
	NF-Kb2	p100 → p52	NFKB2
II	Rel A	p65	RELA
	Rel B		RELB
	c - Rel		REL

**Πίνακας 8.** Πρωτεΐνες μέλη οικογένειας NFκB

Η οικογένεια πρωτεϊνών NF-κB χωρίζεται σε δύο (2) υποοικογένειες: τις πρωτεΐνες Rel και τις πρωτεΐνες NF-κB. Όλες οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας έχουν μια υψηλά συντηρημένη περιοχή, την RHD (Rel Homology Domain) αποτελούμενη από μια αλληλουχία 300 αμινοξέων (117). Αυτή η περιοχή θεωρείται κατάλληλη για σύνδεση με το DNA, για διμερισμό καθώς και για τον εντοπισμό στον πυρήνα και για την σύνδεση του αναστολέα IκB.

Όλα τα μέλη της οικογένειας NF-κB έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή και ομοδιμερή. Πρακτικά από τα μέλη της οικογένειας NF-κB θα μπορούσαν να σχηματιστούν 15 διαφορετικά διμερή (ομοδιμερή και ετεροδιμερή), αλλά *in vivo* μόνο 14 έχουν βρεθεί. Έχει αποδειχτεί ότι η πρωτεΐνη RelB σχηματίζει μόνο ετεροδιμερή (118). Από αυτά τα διμερή, το ετεροδιμερές p50/p65 είναι το πιο συχνό NF-κB/Rel σύμπλοκο. (Εικόνα 8)

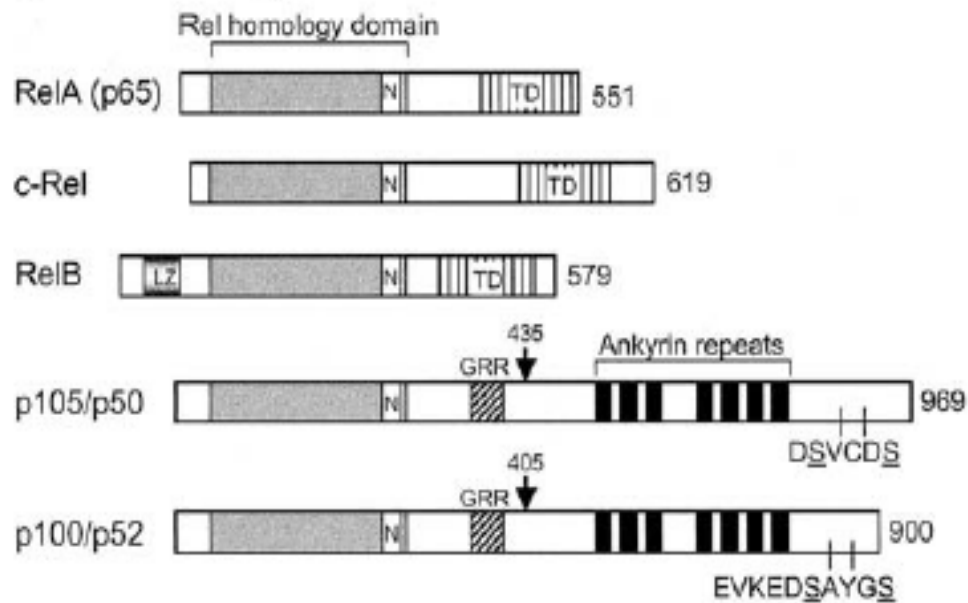


**Εικόνα 8.** Τα πιθανά διμερή που μπορούν να σχηματιστούν από τα 5 μέλη της οικογένειας NF-κB στον άνθρωπο

### 2.3 Η γενική δομή της οικογένειας NF-κB στα θηλαστικά

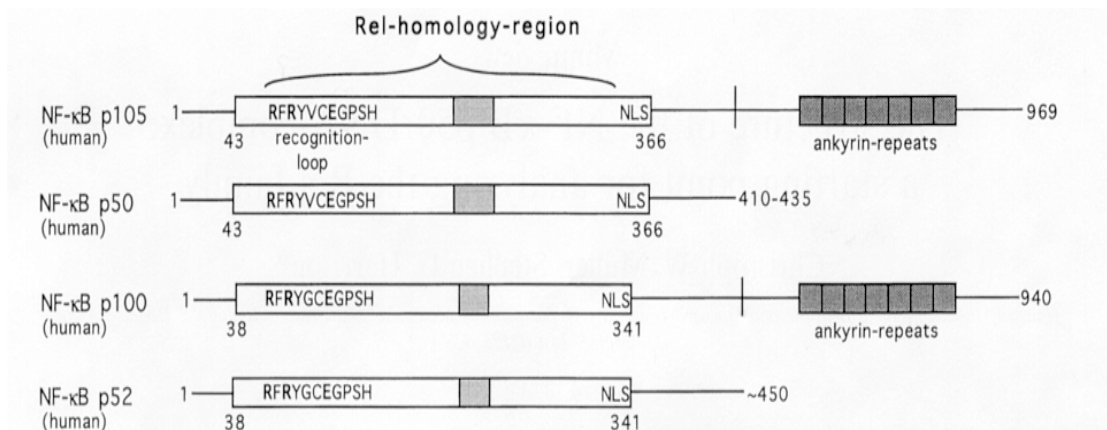
Οι πρωτεΐνες της υποομάδας Rel στο καρβοξυτελικό τους άκρο έχουν περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD–Transcriptional Activation Domain). Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων – στόχων. Όπως γίνεται αντιληπτό, τα διμερή NF-κB που αποτελούνται από μία τουλάχιστον πρωτεΐνη με την TAD περιοχή δρουν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής.

Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες της υποομάδας NF-κB, στο καρβοξυτελικό τους άκρο φέρουν ανασταλτικές περιοχές επαναλαμβανόμενης αγκυρίνης οι οποίες μπορούν να απομακρυνθούν με πρωτεόλυση μέσω πρωτεασώματος. (Εικόνα 9)



**Εικόνα 9.** Οι RelA, RelB και η c-Rel περιέχουν την Rel homology domain (RHD) και την transcriptional activation domain (TAD), ενώ οι p105 και p100 περιέχουν επίσης της Rel homology domain (RHD) αλλά περιέχουν και επαναλήψεις αγκυρίνης – ankyrin repeats (ANK).

Οι p65, c-Rel, RelB παράγονται εξ' αρχής ως μεταγραφικά ενεργές πρωτεΐνες οι οποίες διαθέτουν ένα ενεργό μεταγραφικά καρβοξυτελικό άκρο. Η NF-κB1/p105 και η NF-κB2/p100 αποτελούν ανενεργά πρόδρομα μόρια και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Από αυτά με μετα-μεταγραφική τροποποίηση προκύπτουν οι πρωτεΐνες p50 και p52 αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται πρωτεολυτική αποικοδόμηση της καρβοξυτελικής τους περιοχής, μετατρέποντάς αυτές στις ώριμες πρωτεΐνες p50 και p52, οι οποίες και επιτρέπεται να μπουν στον πυρήνα (119). Έχει αποδειχτεί ότι η μετατροπή της p105 σε ενεργή πρωτεΐνη p50 είναι επουσιώδης, ενώ η μετατροπή της p100 σε p52 είναι σημαντική για την οργανογένεση των περιφερικών λεμφικών ιστών καθώς και για την ανάπτυξη των B λεμφοκυττάρων. Η επαγωγή της μετατροπής της p100 σε p52 γίνεται από ουσίες (συνδεόμενα μόρια) που ενεργοποιούν τον NF-κβ (120)(110). (Εικόνα 10)



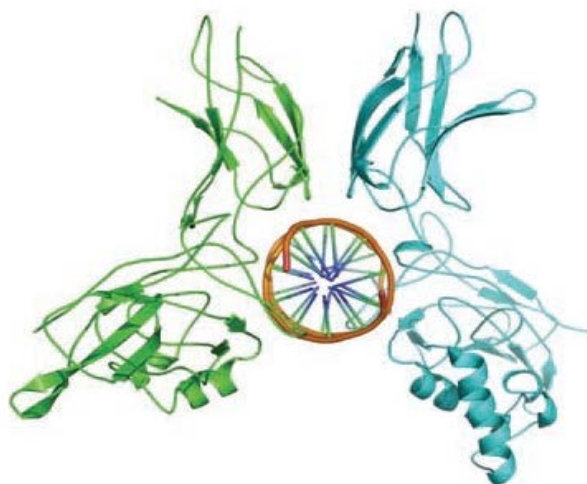
**Εικόνα 10.** Οι πρωτεΐνες p50 και p52 είναι προϊόντα πρωτεολυτικής αποικοδόμησης από τις πρόδρομες μορφές p105 και p100

Οι πρωτεΐνες p50 και p52 συνήθως σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με μία από τις τρεις πρωτεΐνες που έχουν την περιοχή TD (Transactivation Domain). Οι πρωτεΐνες RelA και p50 υπάρχουν σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων ενώ η c-Rel εντοπίζεται μόνο στα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και στα λεμφοκύτταρα. Η έκφραση δε της πρωτεΐνης RelB είναι περιορισμένη σε συγκεκριμένα σημεία, όπως στο θύμο αδένα, στους λεμφαδένες και στις πλάκες του Peyer (115).

Τα σύμπλοκα NF-κB, που αποτελούνται από μέλη τα οποία δεν έχουν την περιοχή TD, θεωρούνται ότι είναι υπεύθυνα για την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων (121).

Κάθε διμερές NF-κB έχει διαφορετική συγγένεια σύνδεσης με αλληλουχίες DNA, γνωστές ως κB αλληλουχίες (50- GGGRNNYYCC-30; R-πουρίνη, Υ-πυριμιδίνη, N=οποιαδήποτε βάση), οι οποίες βρίσκονται σε περιοχές εκκινήτων και ενισχυτών πολλών γονιδίων (122).

Παραδείγματα πολύ γνωστών κB αλληλουχιών, στις οποίες συνδέονται τα διμερή NF-κB, είναι αυτές που βρίσκονται στον ενισχυτή της ελαφριάς κ αλυσίδας των αντισωμάτων (GGGACTTTCC) όπως έχει ήδη αναφερθεί, καθώς και αυτές που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης  $\beta$  (GGGAAATTCC) (112)(123). (Εικόνα 11)



**Εικόνα 11.** Δομή του συμπλόκου: ετεροδιμερές p53/p50 και του DNA

#### 2.4 Ανασταλτικές πρωτεΐνες IκB - Inhibitor of NF-κB

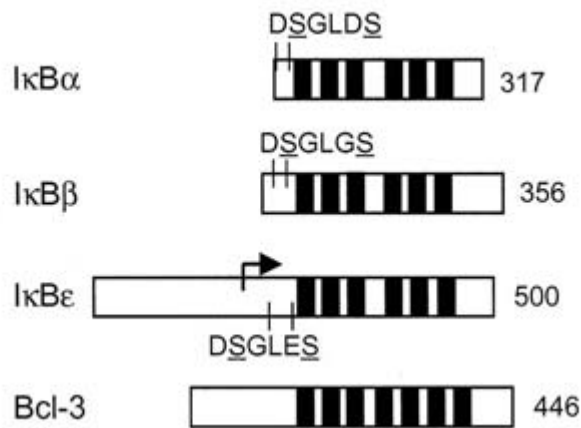
Ο NF-κB εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα όλων σχεδόν των κυτταρικών τύπων και η δράση του ελέγχεται από μια οικογένεια ρυθμιστικών πρωτεϊνών, που ονομάζονται αναστολείς του NF-κB (IκB– Inhibitors of NF-κB) (122).

Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, σε μη διεγερμένα κύτταρα, τα διμερή του NF-κB συγκρατούνται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή από τις πρωτεΐνες IκB. Οι IκB είναι ειδικοί αναστολείς που δεσμεύονται στην RHD περιοχή και περιλαμβάνουν τα εξής μέλη: IκBa, IκBb, IκBc, IκBe, Bcl-3, IκBZ, IκBNS.

Οι ανενεργείς πρωτεΐνες p105 και p100 περιέχουν επίσης στο καρβοξυτελικό τους άκρο επαναλήψεις αγκυρίνης γι' αυτό και συγκαταλέγονται στην οικογένεια των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB.

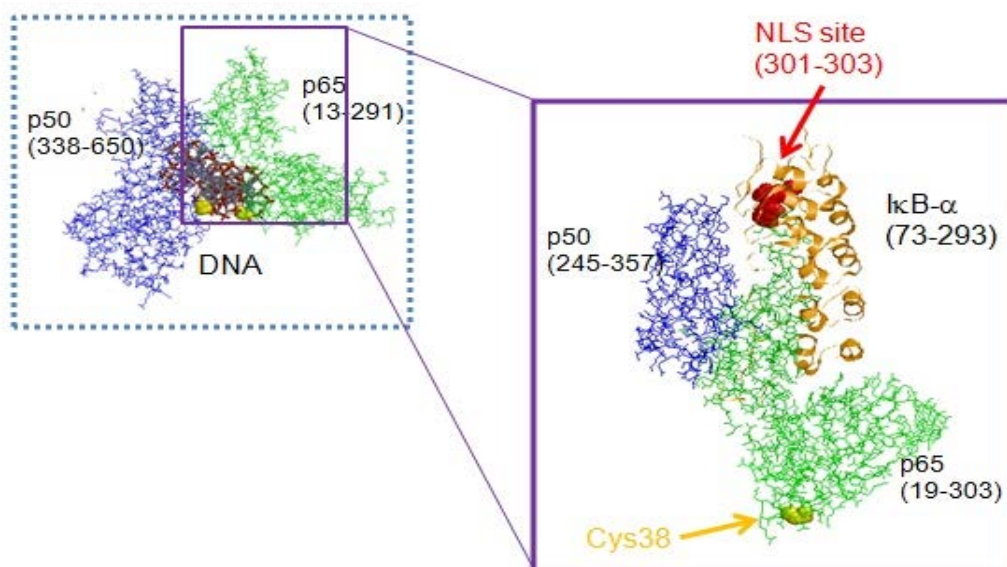
Τα μέλη της οικογένειας IκB, και πιο συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες IκBa, IκBb, IκBe, και Bcl-3 έχουν 6-7 επαναλήψεις αγκυρίνης, οι οποίες αποτελούνται από μια αλληλουχία 33 αμινοξέων υπεύθυνες για τη σύνδεσή τους με τα διμερή NF-κB, εμποδίζοντας έτσι την είσοδό του στον πυρήνα. (Εικόνα 12)

## IκB family



**Εικόνα 12.** Τα μέλη της οικογένειας IκB στα θηλαστικά. Τα μέλη της οικογένειας IκB, συμπεριλαμβανομένου των p105 και p100, χαρακτηρίζονται από επαναλήψεις αγκυρίνης. Περιέχουν επίσης αμινοξικές ακολουθίες, η φωσφορυλίωση των οποίων οδηγεί στην αποικοδόμησή τους.

Οι IκB πρωτεΐνες θεωρούνταν ότι συγκρατούσαν τα διμερή NF-κB στο κυτταρόπλασμα αποκρύπτοντας τις αλληλουχίες NLSs–Nuclear Localization Sequences των πρωτεϊνών NF-κB. Ωστόσο, στην πορεία αποδείχτηκε πως οι πρωτεΐνες IκBα και IκBε πηγαиноέρχονται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος με τη μορφή συμπλόκων NF-κB/IκB. Επομένως αυτά τα σύμπλοκα είναι ικανά να απομακρύνουν τον NF-κB από τις DNA αλληλουχίες – στόχους και να τον μεταφέρουν πίσω στο κυτταρόπλασμα (8). (Εικόνα 13)



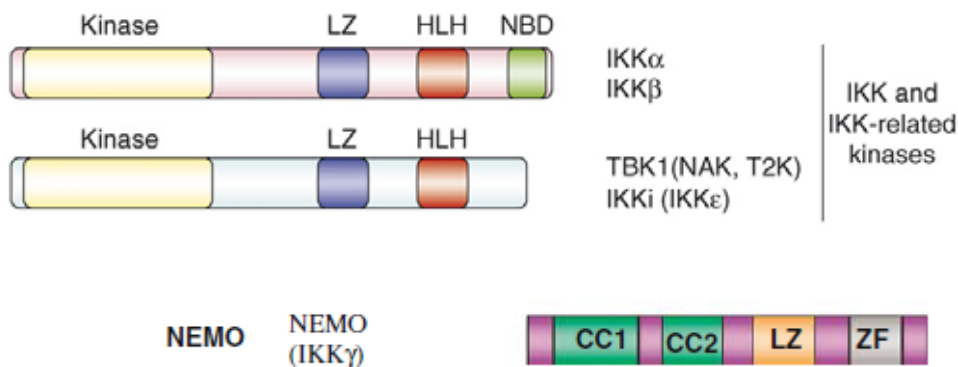
**Εικόνα 13.** Δομή του συμπλόκου NF-κB (p50/p65) με τον IκB αναστολέα (χρήση ακτίνων X)



## 2.5 Ρύθμιση σηματοδοτικής οδού NFκB

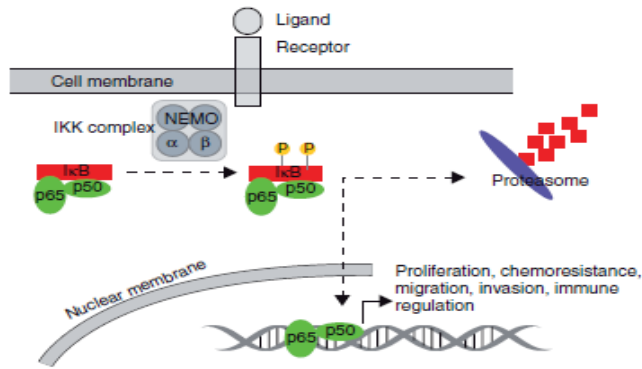
Ο NF-κB ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα. Παράγοντες, όπως η IL-1 και ο TNF-α, διεγείρουν το «κανονικό», όπως αναφέρεται, μονοπάτι ενώ ο CD40, ο BAFF (B-cell activating factor) και η LT-b (lymphotoxin-B) το «μη κανονικό» (124)(125).

Υπάρχουν δύο (2) μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κB τα οποία είναι γνωστά ως «κανονικό» και «μη κανονικό» ή κλασσικό και εναλλακτικό μονοπάτι. Το αρχικό κοινό βήμα και στα δύο μονοπάτια είναι η ενεργοποίηση του συμπλόκου της IκB κινάσης (IKK). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται κυρίως από τις υπομονάδες IKKα, IKKβ και από μια ρυθμιστική πρωτεΐνη IKKc (ή αλλιώς NEMO - NF-κB Essential Modulator). (Εικόνα 14)



**Εικόνα 14.** Σύμπλοκο IKK

Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο IKK φωσφορυλιώνει τον αναστολέα IκB, ο οποίος αποδομείται από το 26S πρωτεάσωμα και τα διμερή NF-κB απελευθερώνονται, εισέρχονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων – στόχων. (Εικόνα 15)

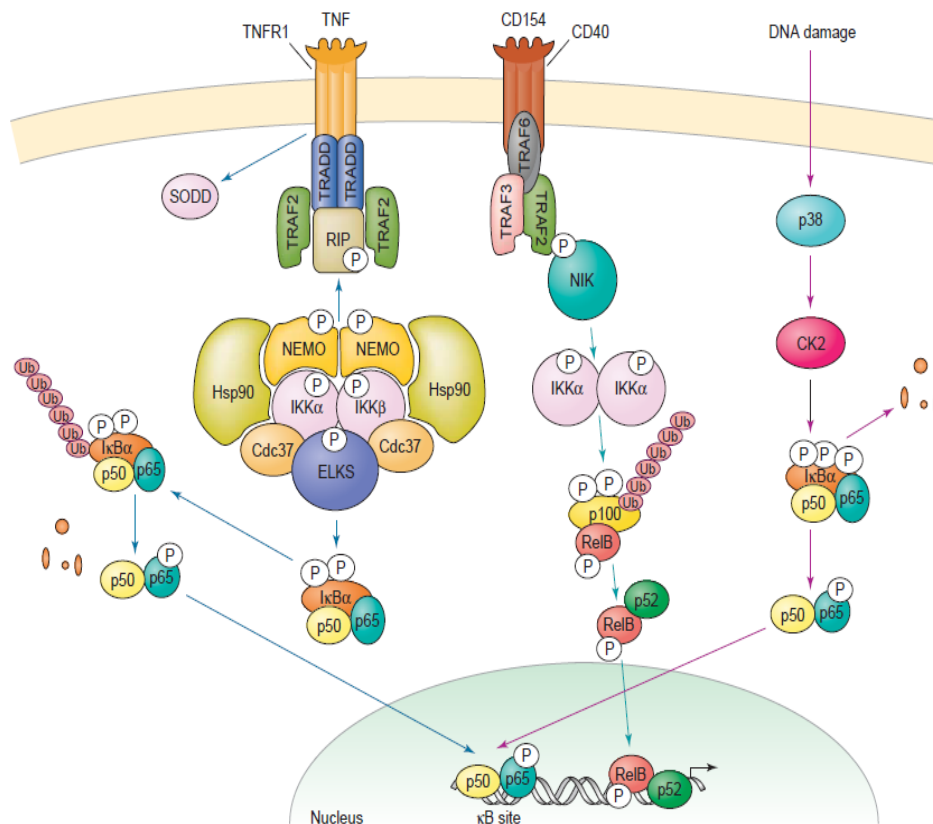


**Εικόνα 15.** Μονοπάτι ενεργοποίησης NF-κB

Τις περισσότερες φορές η ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κB είναι προσωρινή και κυκλική, όταν ο εκκινητής είναι συνεχώς παρών.

### 2.6 Μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB

Υπάρχουν πολλά μονοπάτια ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Η πλειοψηφία των οποίων στηρίζεται στις συνεχώς ενεργές κινάσες. (Εικόνα 16)



**Εικόνα 16.** Το κανονικό, το εναλλακτικό και το άτυπο μονοπάτι

Το «κανονικό» μονοπάτι ή αλλιώς το κλασσικό επάγεται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor) και η IL-1. Στο κλασσικό μονοπάτι, τα διμερή NF-κB όπως p50/RelA διατηρούνται στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρώντας με ένα ανεξάρτητο μόριο IκB (συχνά με την IκBa). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η δέσμευση ενός μορίου με έναν κυτταρικό υποδοχέα όπως η σύνδεση του TNFα στον υποδοχέα TNF-R1 επιστρατεύει προσαρμοστικές πρωτεΐνες όπως την TRAF2-TNF Receptor Associated Factor 2, την TRADD- TNF Receptor Associated Death Domain protein και την RIP-Receptor Interacting Protein στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα (126). Με τη σειρά τους αυτές οι προσαρμοστικές πρωτεΐνες επιστρατεύουν το σύμπλοκο IKK (IκB-kinase complex), που περιέχει τις καταλυτικές υπομονάδες IKKα και IKKβ και δύο (2) μόρια από την πρωτεΐνη-ικρίωμα NEMO (αλλιώς ονομάζεται IKKγ), κατευθείαν πάνω στο σηματοδοτούμενο σύμπλοκο του TNF-R1 (127)(128). Έτσι ενεργοποιείται το σύμπλοκο και αυτό με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την IκBa σε δύο περιοχές σερίνης (Ser 32 και Ser 36) με αποτέλεσμα την πολυουβικιτινίωση της και την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα 26S (129). Στη συνέχεια το ετεροδιμερές p50-p65 απελευθερώνεται, εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με ειδικές κB περιοχές και ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους, όπως IL-6, IL-8, TNFα και πολλά ακόμη. Το κλασσικό μονοπάτι αυτορυθμίζεται, όπου ο NF-κB ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου IκB κι έτσι ξανασυγκεντρώνεται το σύμπλοκο στο κυτταρόπλασμα από τη νεοσυντιθεμένη IκB πρωτεΐνη.

Επίσης ο NF-κB, επάγει την έκφραση των IL-1 και TNF-α, ενώ τα ίδια μόρια διεγείρουν το μονοπάτι του NF-κB, δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο που διαιωνίζει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις (130).

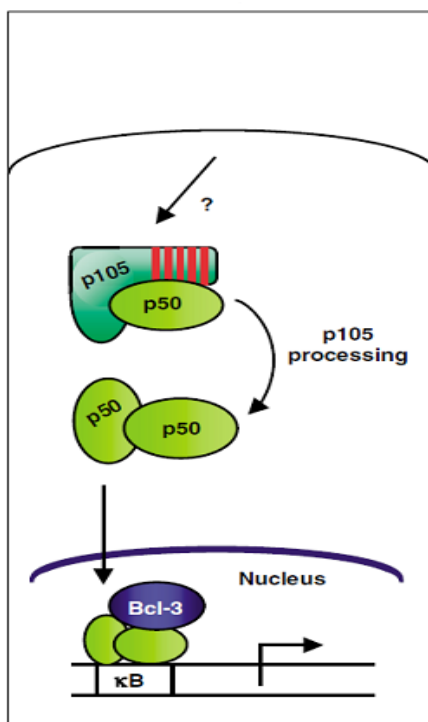
Υπάρχει δεύτερο μονοπάτι NF-κB γνωστό και ως εναλλακτικό ή «Μη-κανονικό» μονοπάτι. Αυτό το μονοπάτι χρησιμοποιείται κυρίως για ενεργοποίηση των p100 / RelB συμπλόκων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των B και T κυττάρων (131).

Το μονοπάτι αυτό διαφέρει από το κλασσικό μονοπάτι στο γεγονός ότι συγκεκριμένα συνδεόμενα μόρια όπως η LT-β (lymphotoxin β), ο BAFF (B-cell activating factor), ο CD40 καθώς και ιοί, όπως ο Epstein-Barr μπορούν να το ενεργοποιήσουν κι επίσης αυτό το μονοπάτι προχωρά μέσω ενός συμπλόκου IKK, που περιέχει δύο υπομονάδες IKKα αλλά δεν περιέχει την πρωτεΐνη - ικρίωμα

NEMO (NEMO-independent pathway) (132). Αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι στηρίζεται στην στρατολόγηση των πρωτεϊνών TRAF στη μεμβράνη και πιο συγκεκριμένα πάνω στην κινάση NIK (NF-κB inducing kinase). Η κινάση NIK ενεργοποιείται και με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί ένα IKKα σύμπλοκο (IKKα ομοδιμερές), το οποίο με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την p100. Πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο IKKα φωσφορυλιώνει δύο (2) σερίνες δίπλα στις επαναλήψεις αγκυρίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της p100, προκαλώντας έτσι τη μερική πρωτεόλυσή του και απελευθέρωση του συμπλόκου p52/RelB. Η προκύπτουσα υπομονάδα p52 δεσμεύεται στην RelB και το ετεροδιμερές μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων-στόχων (133).

Παρόλο που τα δύο (2) μονοπάτια δρουν ταυτόχρονα, ρυθμίζουν διαφορετικές λειτουργίες (119). Το κλασσικό μονοπάτι σταματά τη δράση του, όταν αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό η μεταγραφή των γονιδίων - στόχων, όπως αυτά που κωδικοποιούν κυτοκίνες, μόρια προσκόλλησης, γονίδια που επάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις καθώς και γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επιβίωση των κυττάρων. Από την άλλη η ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού ρυθμίζει την ανάπτυξη των λεμφικών οργάνων και της επίκτητης ανοσίας (131).

Υπάρχουν βέβαια και άλλα διακριτά μονοπάτια. Για παράδειγμα το άτυπο μονοπάτι, που ονομάζεται έτσι επειδή δρα ανεξάρτητα από το σύμπλοκο IKK. Το άτυπο μονοπάτι, ενεργοποιείται από βλάβες που γίνονται στο DNA, όπως μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV(134). Στηρίζεται στη συνεχή ενεργοποίηση των p38 και CK2 – Casein Kinase 2, που έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της IκBa στη σερίνη 293 (Ser293) και τελικά την αποικοδόμησή της μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου της IKK. Έτσι, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι ελεύθερος να μπει στον πυρήνα και να ενεργοποιήσει τα γονίδια-στόχους (135). Ένα ακόμη μονοπάτι το οποίο έχει βρεθεί στηρίζεται στα ομοδιμερή p50 ή p52. Αυτά μπαίνουν στον πυρήνα, όπου γίνονται μεταγραφικοί ενεργοποιητές και η δράση τους ενισχύεται με την αλληλεπίδρασή τους με τον συνενεργοποιητή BCL3 ή με τον IκBz. Το πώς ρυθμίζεται αυτό το μονοπάτι είναι άγνωστο (118). (Εικόνα 17)



**Εικόνα 17.** Άλλο μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB

## 2.7 NFκB και καρκίνος ωοθηκών

Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NF-kB – Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells) εκφράζεται σε πολλούς τύπους ιστών και έχει μελετηθεί εκτενώς σε πολλές κακοήθειες. Έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που διευκολύνουν την ανάπτυξη καρκίνου, που αναστέλλουν την απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, αυξάνουν τη φλεγμονή και την άνοσο – απόκριση και ευθύνονται για την μετάσταση (136)(137).

Η ενεργοποίηση του NF-kB πρέπει να είναι ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο γεγονός. Σε φυσιολογικά κύτταρα, ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας γίνεται ενεργός μόνο μετά από κατάλληλη ενεργοποίηση και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων – στόχων. Από την άλλη, ρυθμιστικοί μηχανισμοί που υπάρχουν στο κύτταρο τον καθιστούν ανενεργό. Στα καρκινικά όμως κύτταρα, διάφοροι τύποι μοριακών αλλαγών μπορεί να συμβούν και να οδηγήσουν σε απώλεια της ρύθμισης της ενεργοποίησής του. Επειδή μελέτες έχουν δείξει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB ενεργοποιείται από προ – φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ότι η ενεργοποίηση του επάγει την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική απόπτωση και την αγγειογένεση, θεωρήθηκε ότι

οποιαδήποτε αλλαγή στη δράση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα μπορεί να είναι υπεύθυνη για φλεγμονώδεις ασθένειες και για διάφορους τύπους καρκίνου.

Η αλλαγή στη δράση του NF-κB μπορεί να οφείλεται στις συνεχείς φωσφορυλιώσεις των NF-κb και των IκB. Συνεχής και μη ελεγχόμενη δράση των IKK, η οποία οδηγεί με τη σειρά της σε συνεχώς αυξημένα επίπεδα του πυρηνικού p65, βρέθηκε σε φλεγμονώδεις ασθένειες καθώς και σε καρκίνους (138)(139)(140).

Πρόσφατα ο ρόλος του NF-κB στην ανάπτυξη του καρκίνου αποδείχτηκε *in vivo*, χρησιμοποιώντας μοντέλα ζώων, όπως ποντίκια με καρκίνο του εντέρου. Στα ποντίκια αυτά πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του IKKb σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και αυτό οδήγησε σε δραματική μείωση του καρκινικού όγκου.

Επίσης, στα ίδια ποντίκια έγινε αφαίρεση του IKKb στα κύτταρα του νωτιαίου μυελού και αυτό οδήγησε σε μείωση του μεγέθους του καρκινικού όγκου πιθανότατα μέσω μείωσης της έκφρασης των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες του καρκίνου (141).

Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στις IκB πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσουν σε συνεχή λειτουργία του NF-κB. Στο λέμφωμα Hodgkin παρατηρήθηκε ότι μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας της IKBa, έχουν ως αποτέλεσμα υψηλή ενεργότητα για τον NF-κB.

Ο NF-κb παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων σε περιβαλλοντικές αλλαγές. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού του μονοπατιού έχει παρατηρηθεί σε επιθηλιακούς όγκους, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου καθώς και των ωοθηκών.

Η χρόνια φλεγμονή έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Στις ωοθήκες η καρκινογένεση θεωρείται άμεσα συνδεδεμένη με φλεγμονώδεις διαδικασίες, όπως επαναλαμβανόμενη ωορρηξία, ενδομητρίωση και μολύνσεις στην περιοχή της λεκάνης (142). Ο μοριακός σύνδεσμος ανάμεσα στη φλεγμονή και στον καρκίνο είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB.

Έχει βρεθεί ότι από τους καρκίνους που εμφανίζονται στο γυναικείο φύλο, μόνο το 3% είναι καρκίνος στις ωοθήκες. Παρόλο όμως το μικρό ποσοστό έχει αποδειχτεί ότι ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί την 5<sup>η</sup> πιο συχνή αιτία θανάτου στις γυναίκες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί εκτενέστερα και νωρίτερα, ο επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών (EOC- Epithelial Ovarian Cancer) αποτελεί τον πιο συχνό ιστολογικό τύπο του καρκίνου των ωοθηκών και θεωρείται η πιο θανατηφόρα κακοήθεια από όλες τις γυναικολογικές. Δεδομένου ότι εμφανίζεται χωρίς συγκεκριμένα συμπτώματα και επειδή δεν υπάρχουν μέσα έγκαιρης διάγνωσης, οι ασθενείς όπως είπαμε διαγιγνώσκονται στα τελευταία στάδια της νόσου (International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage III or IV). Παρά τη χειρουργική και ογκολογική αντιμετώπιση που ήδη αναφέραμε, και η οποία ακολουθεί τη διάγνωση της νόσου (αναλόγως πάντα του σταδίου), μόλις τελικά το 80% των ασθενών ανταποκρίνονται στην αγωγή (143). Παρά ωστόσο την αρχική ανταπόκριση, η πλειοψηφία των ασθενών υποτροπιάζει σε χρονικό διάστημα από έξι (6) μήνες μέχρι περίπου δύο (2) χρόνια μετά την θεραπεία, με αποτέλεσμα η ασθένεια να εξελίσσεται και τελικά οι ασθενείς να οδηγούνται στο θάνατο. Μόλις το 15-20% των ασθενών ζει πέντε (5) χρόνια μετά τη διάγνωση της ασθένειας στα τελευταία στάδια (144).

Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και της κλινικής εικόνας των γυναικών με EOC. Μελέτες, στις οποίες υπολογίστηκαν τα επίπεδα κυρίως της υπομονάδας p65 αλλά και της RelB, έδειξαν ότι τα επίπεδα του NF-kB σχετίζονται με τον χρόνο επιβίωσης των ασθενών. Αποδείχτηκε ότι η έκφραση της υπομονάδας NF-kB p65 στους επιθηλιακούς καρκίνους των ωοθηκών είναι κυρίως πυρηνική και ότι τα επίπεδά του συσχετίζονται με τα τελευταία στάδια της ασθένειας (145). Ακόμη, φάνηκε ότι οι ασθενείς με EOC, στις οποίες εντοπίζονταν ο p65 στον πυρήνα, είχαν χαμηλότερο μέσο όρο επιβίωσης (24 μήνες περίπου) σε σχέση με τις ασθενείς με EOC στις οποίες η υπομονάδα p65 δεν εντοπίζονταν πυρηνικά (39 μήνες περίπου) (146)(147).

In vitro πειράματα έδειξαν ότι η αναστολή του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB, είτε χρησιμοποιώντας μικρά μόρια αναστολής είτε χρησιμοποιώντας μικρά μόρια RNA, όπως το siRNA (short interfering RNA), επηρεάζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών (EOC). Σε άλλες μελέτες με τη χρήση του micro RNA-9 (miR-9), και συγκεκριμένα υπερεκφράζοντάς το, κατάφεραν να μειώσουν τα επίπεδα του NF-kB1, οπότε και πάλι παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων EOC, και πιο συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά ES-2 (148).

Σε άλλη έρευνα αποδείχθηκε ότι στις κυτταρικές σειρές CAOV3, IGROV1 και A2780 αναστέλλοντας τον IKKb, εμποδίζεται η δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των ζωντανών κυτάρων. Επιπρόσθετα φάνηκε πως μπλοκάροντας τη δράση του IKKb με siRNA αναστέλλεται η μεταναστευτική ικανότητα των κυτάρων. Η ίδια ερευνητική ομάδα κατάφερε να βρει τα γονίδια που ελέγχονται από το IKKb-NF-kB μονοπάτι που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την διήθηση και γενικά τη δημιουργία ενός προ – φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος (149).

Στον καρκίνο των ωοθηκών, η αυξημένη δράση του NF-kB θεωρείται δείκτης για την πρόβλεψη της πορείας του καρκίνου ενώ θεωρείται ότι προσφέρει και αντίσταση στην επαγόμενη από φάρμακα (όπως cisplatin) απόπτωση. Παράλληλα φάνηκε πως η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-kB αυξάνει την επιθετικότητα του καρκίνου των ωοθηκών (149).

Σε ό,τι αφορά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-kB και την αλληλεπίδραση αυτού με το μηχανισμό δράσης ενός ακόμα κλασικού σκεύασματος στην αντιμετώπιση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών, την paclitaxel, τα δεδομένα από τις μελέτες είναι αντικρουόμενα. Υπήρξε μια μελέτη που ανέφερε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού μειώνει την επαγόμενη από το φάρμακο paclitaxel απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών (150), ενώ άλλες μελέτες έδειξαν ότι ο NF-kB μεσολαβεί στην επαγόμενη από το φάρμακο paclitaxel απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών (151).

Επίσης έχει δειχθεί ότι ο καρκίνος των ωοθηκών αντιστέκεται στην απόπτωση που επάγεται από τον TNF $\alpha$ – Tumor Necrosis Factor alpha, επειδή τα καρκινικά κύτταρα προκαλούν την αύξηση της έκφρασης μονοπατιών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-kB και στην επαγωγή πρωτεϊνών που εμποδίζουν την απόπτωση (152). Επιπρόσθετα, η αναστολή του NF-kB μέσω του I $\kappa$ B $\alpha$  στην καρκινική σειρά ωοθηκών SKOV3, οδήγησε σε μειωμένη έκφραση των VEGF και IL-8, οδηγώντας σε μειωμένη ογκογένεση, δυεισδυτικότητα και αγγειογένεση σε ποντίκια με έλλειψη θυρεοειδούς αδένα (151).

Γενικά στον καρκίνο των ωοθηκών αυξάνεται η λειτουργία του μονοπατιού NF-Kb, με αποτέλεσμα να παρακάμπτονται τα μονοπάτια που ενεργοποιούν την απόπτωση και να δημιουργεί ένα περιβάλλον αντίστασης στη χημειοθεραπεία. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει αποκαλύψει πολλούς και διαφορετικούς

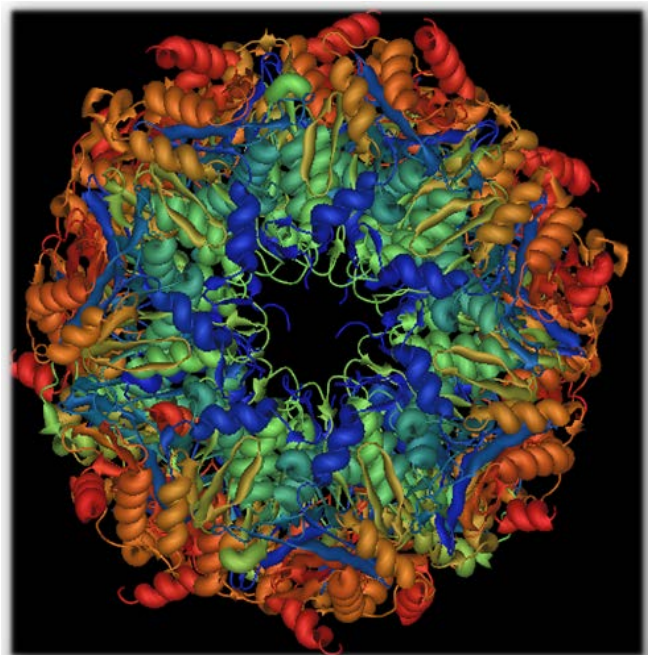


μηχανισμούς με τους οποίους ο NF-κB εμπλέκεται στον καρκίνο των ωοθηκών. Υπάρχουν πολλές και σοβαρές ενδείξεις ότι υπάρχει καθαρή σύνδεση του NF-κB και της καρκινογένεσης, γι' αυτό και αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο για θεραπεία.

## 2.8 Η οδός NFκB-Ubiquitin-πρωτεασώματος

### 2.8.1 Δομή και λειτουργία UPS

Τα πρωτεασώματα είναι μεγάλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα στο εσωτερικό όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών και ορισμένων βακτηρίων. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς βρίσκονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Η κύρια λειτουργία τους συνίσταται στην απορρύθμιση άχρηστων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών μέσω της πρωτεόλυσης. (Εικόνα 18)

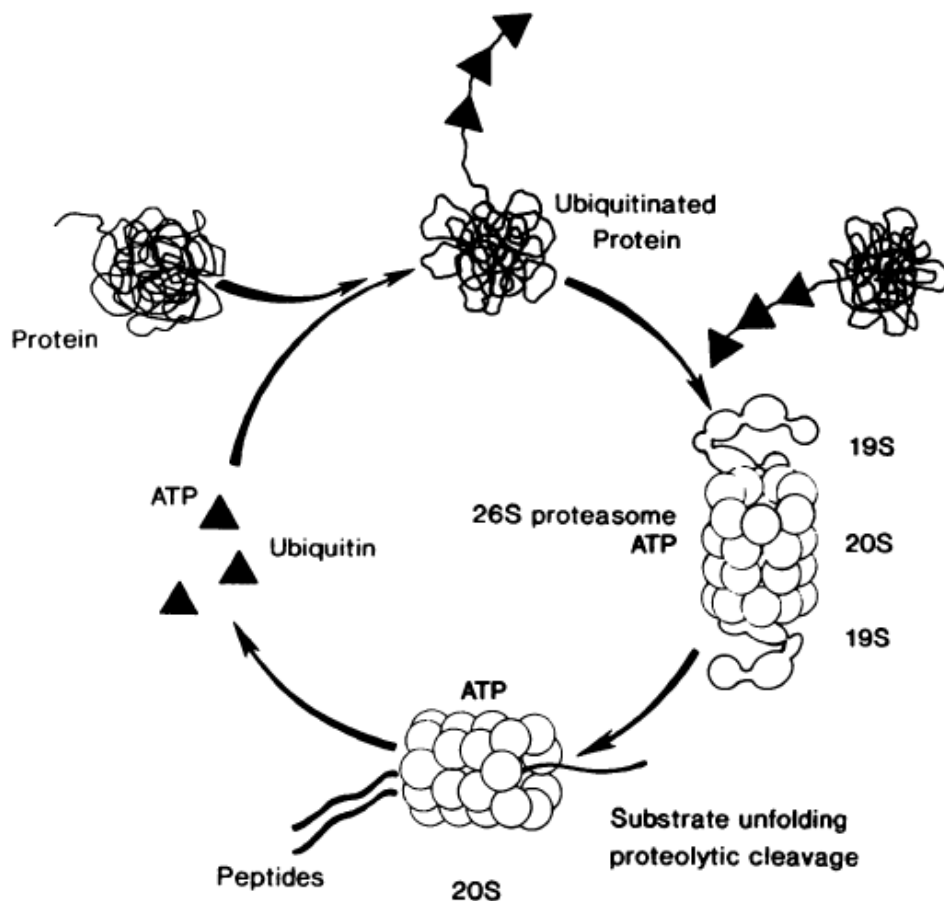


**Εικόνα 18.** Μόριο ουμπικουιτίνης

Οι πρωτεΐνες που πρόκειται να διασπαστούν ενώνονται με μια μικρή πρωτεΐνη που ονομάζεται ουμπικουιτίνη. Το πρώτο στάδιο στο σύστημα της ουμπικουιτίνης είναι η ενεργοποίηση της γλυκίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της ουμπικουιτίνης από ένα ένζυμο (E1). Αυτό το βήμα χρειάζεται ενέργεια για να πραγματοποιηθεί. Στη συνέχεια η ενεργή ουμπικουιτίνη μεταφέρεται σε μια οικογένεια πρωτεϊνών – μεταφορείς ουμπικουιτίνης (ubiquitin-conjugating enzymes, E2). Η σύνδεση της ουμπικουιτίνης με την πρωτεΐνη που πρόκειται να αποδομηθεί μπορεί να

πραγματοποιηθεί με την απευθείας μεταφορά της ουμπικουϊνής από την E2 ή με μια διαδικασία στην οποία οι πρωτεΐνες – στόχοι πρώτα συνδέονται με συγκεκριμένα σημεία της λιγκάσης της ουμπικουϊνής E3, πριν η ουμπικουϊνή μεταφερθεί από την E2.

Η προσθήκη πολλών μορίων ουμπικουϊνής σε μια πρωτεΐνη (πολυουμπικουϊνωση) οδηγεί στον σχηματισμό αλυσίδων ουμπικουϊνής πάνω στην πρωτεΐνη - στόχο με αποτέλεσμα αυτή να «μαρκάρεται» για μεταφορά και αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα 26S. Ο αριθμός των μορίων ουμπικουϊνής που συνδέονται με κάθε πρωτεΐνη είναι συγκεκριμένος για κάθε πρωτεΐνη και επίσης επηρεάζει το ρυθμό με τον οποίο οι πρωτεΐνες θα αποδομηθούν. (Εικόνα 19)



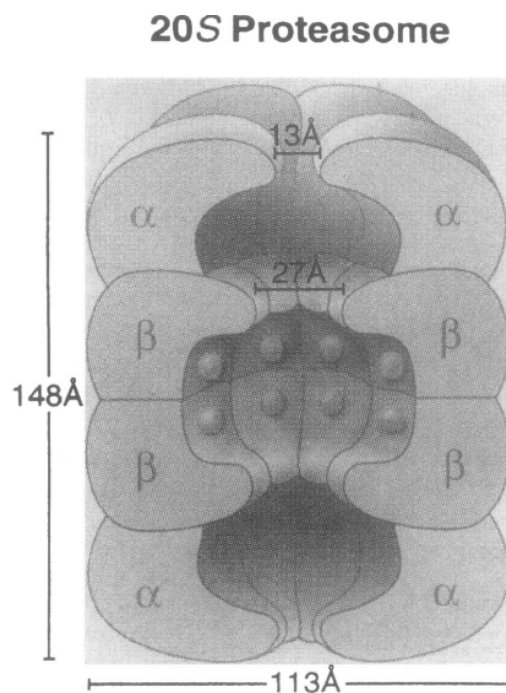
**Εικόνα 19.** Σχήμα που απεικονίζει το μονοπάτι πρωτεολυτικής αποδόμησης εξαρτώμενο από την ουμπικουϊνή. Τα τρία (3) σημαντικά στάδια είναι η ενεργοποίηση της ουμπικουϊνής, η δημιουργία του 26s πρωτεασώματος και η αποδόμηση της πρωτεΐνης που φέρει πολλά μόρια ουμπικουϊνής

Ένα ακόμη βήμα που απαιτεί ενέργεια στο μονοπάτι της ουμπικουϊνής είναι η συγκρότηση του 26S πρωτεασώματος. Το σύμπλοκο αυτό έχει μοριακό βάρος

από 1000-1500kd και σχηματίζεται από την ένωση τριών συστατικών, του πρωτεασώματος 20S και δύο μορίων 19S. Μετά την πρωτεόλυση, η ουμπικουιτίνη απελευθερώνεται από την αλυσίδα ουμπικουιτίνης και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί στο πρωτεολυτικό μονοπάτι.

### 2.8.2 Το πρωτεάσωμα

Πριν από περίπου 50 χρόνια, μελέτες με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξαν την παρουσία μορίων πρωτεΐνης σε εκχυλίσματα ανθρώπινων ερυθροκυττάρων. Ωστόσο, η σημασία αυτών των μορίων εκείνη την εποχή ήταν άγνωστη (153). Τελικά αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια είναι το 20S πρωτεάσωμα που αποτελεί τον πυρήνα πρωτεόλυσης για το σύμπλοκο 26S. (Εικόνα 20)

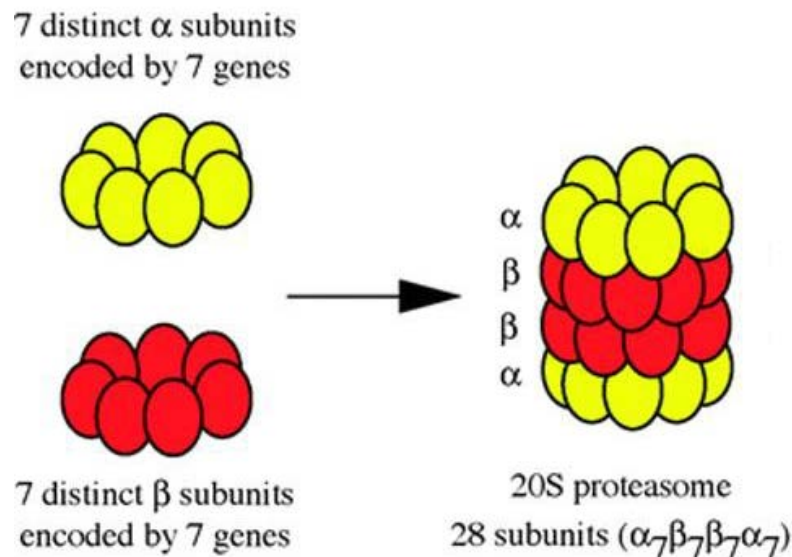


**Εικόνα 20.** Πρωτεάσωμα

Το 20S πρωτεάσωμα είναι ένα κυλινδρικό μόριο που αποτελείται από τέσσερα (4) δαχτυλίδια, που στοιβάζονται το ένα πάνω από το άλλο (154). Κάθε δαχτυλίδι αποτελείται από πρωτεϊνικές υπομονάδες με μοριακό βάρος από 19 έως 36 kd. Οι υπομονάδες των εξωτερικών δαχτυλιδιών ονομάζονται α-υπομονάδες, ενώ οι υπομονάδες των δύο εσωτερικών δαχτυλιδιών ονομάζονται β-υπομονάδες, οπότε η γενική δομή του 20S πρωτεασώματος είναι α-β-β-α.(154)

Γενικά θεωρείται ότι οι περιοχές κατάλυσης εντοπίζονται στην εσωτερική περιοχή των β-υπομονάδων, ενώ οι α-υπομονάδες χρησιμεύουν για τη διάκριση υποστρώματος. Τα δαχτυλίδια αυτά συγκεντρώνονται το ένα πάνω από το άλλο

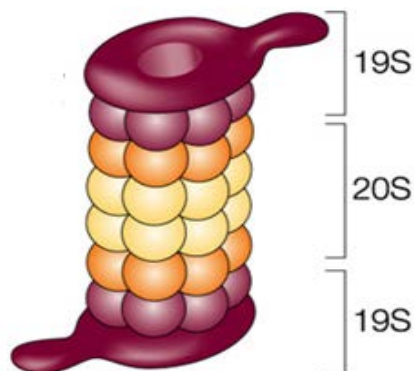
και σχηματίζουν ένα “τούνελ” μέσα στο οποίο συγκεντρώνεται η πρωτεΐνη που πρόκειται να αποδομηθεί. Οι πρωτεΐνες αυτές πριν μαζευτούν στο εσωτερικό του πρωτεασώματος θα πρέπει να περάσουν από δύο στενές περιοχές, για αυτό θα πρέπει τα υποστρώματα αυτά να είναι ξεδιπλωμένα (155). (Εικόνα 21)



**Εικόνα 21.** Η δομή του 20S πρωτεασώματος. Αποτελείται από 2 εξωτερικές υπομονάδες  $\alpha$  και 2 εσωτερικές υπομονάδες  $\beta$ . Ο κάθε δακτύλιος έχει 7 πολυπεπτιδικές υπομονάδες

Η δραστηριότητα του 20S πρωτεασώματος ρυθμίζεται από ένα σύνολο διαφορετικών πρωτεϊνών. Ανάμεσα στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες είναι και το σύμπλοκο 19S που είναι σημαντικό για την ρύθμιση της αποδόμησης των πρωτεϊνών συνδεδεμένων με μόρια ουμπικουϊνής από το 26S πρωτεάσωμα (156).

Η λειτουργία του συμπλόκου 19S είναι να αναγνωρίζει, να μεταφέρει και να ξεδιπλώνει τα υποστρώματα στο 20S πρωτεάσωμα. Κάθε ένα 19S σύμπλοκο προσκολλάται στο κυλινδρικό άκρο του 20S πρωτεασώματος και έτσι σχηματίζεται το 26S πρωτεάσωμα. (Εικόνα 22)

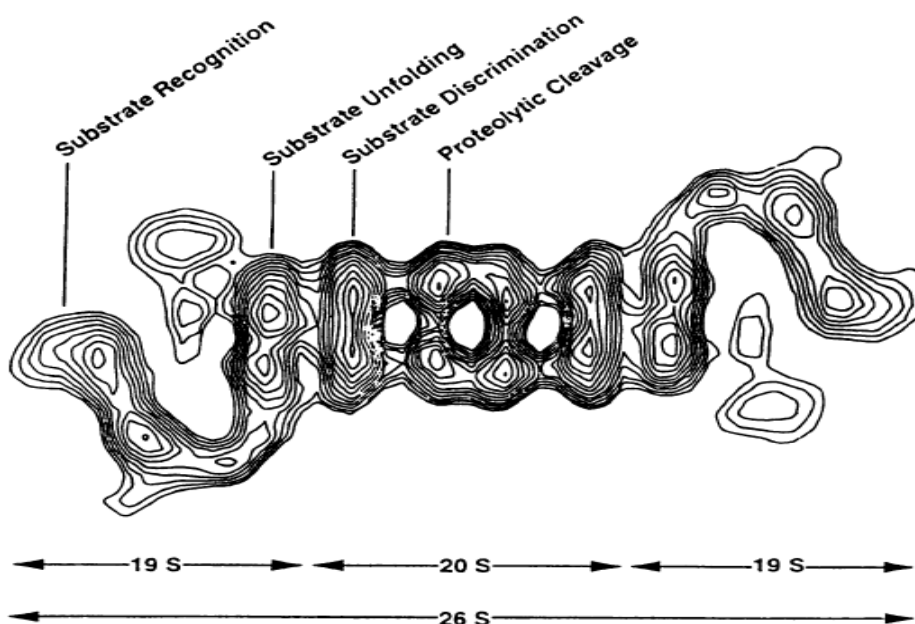


Nature Reviews | Cancer

**Εικόνα 22.** Η δομή του 26S πρωτεασώματος. Έχει έναν 20S πυρήνα και δύο 19S ρυθμιστικές περιοχές.

Έχει διαπιστωθεί ότι διαφορετικές περιοχές του συμπλόκου 19S είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση των πρωτεϊνών και διαφορετικές περιοχές είναι υπεύθυνες για το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών του υποστρώματος. Το 26S πρωτεάσωμα δείχνει μια επιλεκτικότητα για τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με μόρια ουμπικουΐνης.

Το 26S πρωτεάσωμα φαίνεται να συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου, όπως πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ανάπτυξη, μεταβολισμός, κυτταρική διαφοροποίηση και απόπτωση. (Εικόνα 23)



**Εικόνα 23.** Τομή του 26S πρωτεασώματος. Διαφορετικές λειτουργίες αποδίδονται στα διαφορετικά συστατικά του πρωτεασώματος

Το 26S πρωτεάσωμα και από τις δύο (2) μεριές έχει ως κάλυμμα το σύμπλοκο 19S, πιθανολογείται ότι η πολύ-ουμπικιτιλιωμένη πρωτεΐνη μπορεί να μπει στο πρωτεολυτικό σύμπλοκο και από τις δυο μεριές.

Η σειρά των γεγονότων που θεωρείται ότι ισχύει για την τελική αποδόμηση της πρωτεΐνης – υποστρώματος από το 26S πρωτεάσωμα είναι η εξής: Η αλυσίδα από μόρια ουμπικουΐνης που υπάρχει πάνω στην πρωτεΐνη – στόχο δεσμεύεται πάνω σε συγκεκριμένα σημεία του 19S συμπλόκου. Έπειτα ακολουθεί ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης και μετακίνησή της, τα οποία στάδια απαιτούν κατανάλωση ενέργειας (ATP) με σκοπό η ξεδιπλωμένη αλυσίδα να μπει μέσα στο κεντρικό κανάλι του 20S πρωτεασώματος. Η πρωτεΐνη – υπόστρωμα κόβεται σε μικρότερα κομμάτια και τελικά τα κομμάτια αυτά απελευθερώνονται από μικρά ανοίγματα του 26S πρωτεασώματος. Οι αλυσίδες ουμπικουΐνης που υπάρχουν στα κατάλοιπα του πρωτεασώματος αποσυναρμολογούνται κι έτσι διευκολύνεται η απομάκρυνσή τους από το πρωτεάσωμα (157).

Το 26S πρωτεάσωμα θεωρείται ότι εμπλέκεται και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως σε αυτοάνοσα νοσήματα (ρευματοειδής αρθρίτιδα), σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, σε ιογενείς μολύνσεις καθώς και στον καρκίνο. Πολλές από αυτές τις παθολογικές διαταραχές οφείλονται σε ανεπάρκεια των ενζύμων E2 και E3 ή σε γενωμικές ή μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών οι οποίες επηρεάζουν την ουβικουΐνωση τους και κατ' επέκταση την αποσύνθεσή τους στο πρωτεάσωμα.

Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι το πρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Εξαιτίας του ρόλου του πρωτεασώματος στη ρύθμιση της ενεργής μορφής του παράγοντα NFκΒ, του αντιαποπτωτικού και προαντιφλεγμονώδους ρυθμιστή της έκφρασης των κυτοκινών, η δραστηριότητα του πρωτεασώματος έχει συνδεθεί με αντιφλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα.

### *Κεφάλαιο 3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α*

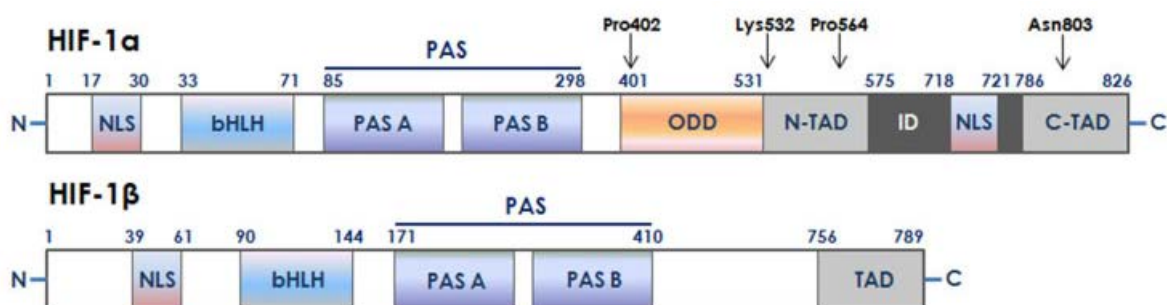
#### *3.1 Δομή και λειτουργία*

Η ρύθμιση των επιπέδων οξυγόνου (ομοιοστατικός μηχανισμός) είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία, απαραίτητη για τον μεταβολισμό καθώς και για την επιβίωση των κυττάρων στα ζώντες οργανισμούς.

Η υποξία (ανεπάρκεια οξυγόνου) συμβαίνει στους ιστούς όταν η παροχή οξυγόνου μέσω του κυκλοφορικού συστήματος αποτυγχάνει να καλύψει τις ανάγκες σε οξυγόνο των κυττάρων. Υποξία συμβαίνει φυσιολογικά κατά τη διάρκεια για παράδειγμα της εμβρυϊκής ανάπτυξης, κατά τη διάρκεια έντονης μυϊκής δραστηριότητας αλλά συμβαίνει συχνά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως για παράδειγμα στη φλεγμονή και σε περιπτώσεις καρκίνου (158).

Ο HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1), ή αλλιώς παράγοντας που επάγεται από την υποξία ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1992 από την ικανότητά του να επάγει την έκφραση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας (159).

Ο HIF1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας, και αποτελείται από τις υπομονάδες HIF-1a και HIF-1b. Η υπομονάδα HIF-1b, η οποία αποκαλείται αλλιώς πυρηνικός μεταφορέας αρυλ-υδατανθράκων ARNT εκφράζεται συνεχώς ενώ η άλλη υπομονάδα η HIF-1a έχει επαγόμενη έκφραση και τα επίπεδα της ρυθμίζονται από την μερική πίεση οξυγόνου ( $pO_2$ ) (160). Η έκφρασή της αυξάνεται εκθετικά σε συνθήκες όπου τα κύτταρα είναι εκτεθειμένα σε συγκέντρωση  $O_2$  μικρότερη από 6%, το οποίο αντιστοιχεί σε μερική πίεση  $O_2$  περίπου 40mmHg (161). Τόσο η a υπομονάδα όσο και η b εμφανίζονται με μια σειρά από ισομορφές οι οποίες κωδικοποιούνται από συγκεκριμένες γενετικές θέσεις. (Εικόνα 24)



**Εικόνα 24.** Δομή και λειτουργία του HIF/HIF-1a και HIF-1b

Στην υπομονάδα HIF-1a το αμινοτελικό άκρο της, και πιο συγκεκριμένα στα πρώτα περίπου 390 αμινοξέα, υπάρχουν οι περιοχές bHLH και PAS που είναι

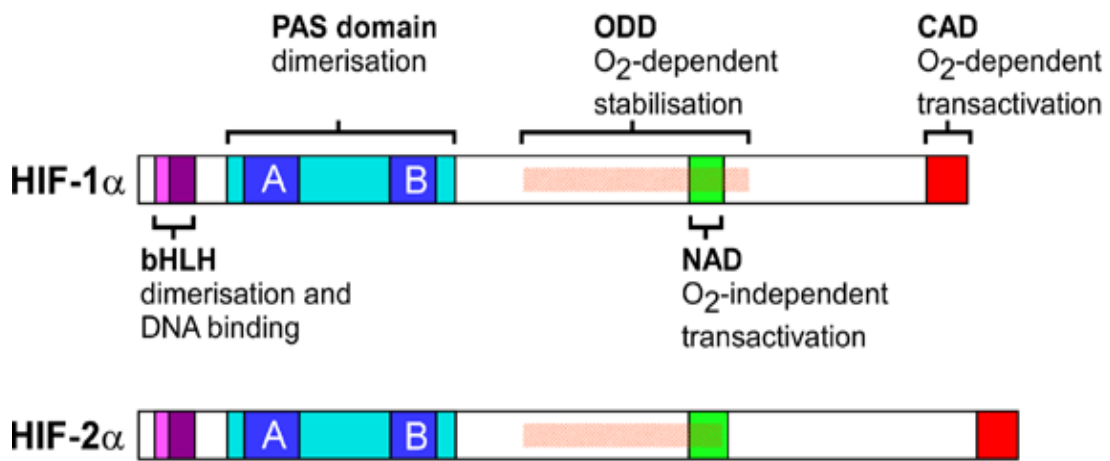
σημαντικές και απαραίτητες για τον διμερισμό αυτής της υπομονάδας με την υπομονάδα HIF-1b καθώς και για τη σύνδεση με το DNA.

Ανάμεσα στα αμινοξέα 429 και 608 εντοπίζεται μια περιοχή πλούσια στα αμινοξέα Προλίνη-Σερίνη-Θρεονίνη (Pro-Ser-Thr rich protein stabilization domain, PSTD) που είναι γνωστή αλλιώς και ως περιοχή αποδόμησης εξαρτώμενη από το οξυγόνο (O<sub>2</sub> – Dependent Degradation Domain ODDD) (162).

Επίσης η υπομονάδα HIF-1a περιέχει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD-Transactivation Domain), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της υπομονάδας από το πρωτεάσωμα καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων – στόχων του HIF-1a. Στο καρβοξυτελικό της άκρο υπάρχει η περιοχή CTAD (Carboxy Terminal Transactivation Domain) με την οποία αλληλεπιδρούν οι συμπαραγοντες CREB binding protein (CBP) και p300, που είναι απαραίτητοι για την μεταγραφή του HIF-1, γι' αυτό το λόγο αποτελούν πιθανούς στόχους στην προσπάθεια ρύθμισης της έκφρασης του HIF1 (163).

Τρεις (3) δομικά συγγενικές α υπομονάδες (HIF-1a, HIF-2a και η HIF-3a) έχουν μέχρι σήμερα ανακαλυφθεί. Και οι δύο (2) αυτές υπομονάδες μοιράζονται ομόλογες αλληλουχίες με την HIF-1a. Η HIF-2a, ονομάζεται αλλιώς και EPAS1-Endothelial PAS domain protein 1, είναι μέρος της διμερούς πρωτεΐνης HIF2 (164). Η HIF-2a έχει παρόμοια δομή με την HIF-1a και είναι και οι δύο ικανές να αλληλεπιδρούν με αλληλουχίες DNA-στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE-Hypoxia Response Elements) και να επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων (165). Η HIF-3a υφίσταται πολλούς και διαφορετικούς τρόπους συρραφής και προκύπτουν διαφορετικές μορφές, ανάμεσα στις οποίες ανήκει η πρωτεΐνη IPAS – Inhibitory PAS domain protein, η οποία και λειτουργεί ως αναστολέας της HIF-1a και γενικά εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής (166). (Εικόνα 25)





**Εικόνα 25.** Η δομή των υπομονάδων HIF-1a και HIF-2a

Και οι δύο (2) υπομονάδες HIF-1a και HIF-1b ανήκουν στην ομάδα των μεταγραφικών παραγόντων με περιοχές βασικής έλικας – θηλειάς – έλικας (basichelix-loop-helix, bHLH) και τη διμερή περιοχή PAS (PER-ARNT-SIM)(160). Οι δύο (2) αυτές περιοχές είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση στο DNA και το διμερισμό. Οι υπόλοιπες περιοχές των αυτομονάδων περιλαμβάνουν μια O<sub>2</sub>-εξαρτώμενη περιοχή αποικοδόμησης (ODDD – O<sub>2</sub> Dependent Degradation Domain) και δύο (2) περιοχές trans ενεργοποίησης. Η HIF-1a είναι η μοναδική υπομονάδα που ρυθμίζεται από το οξυγόνο και καθορίζει τη δραστηριότητα του HIF (167).

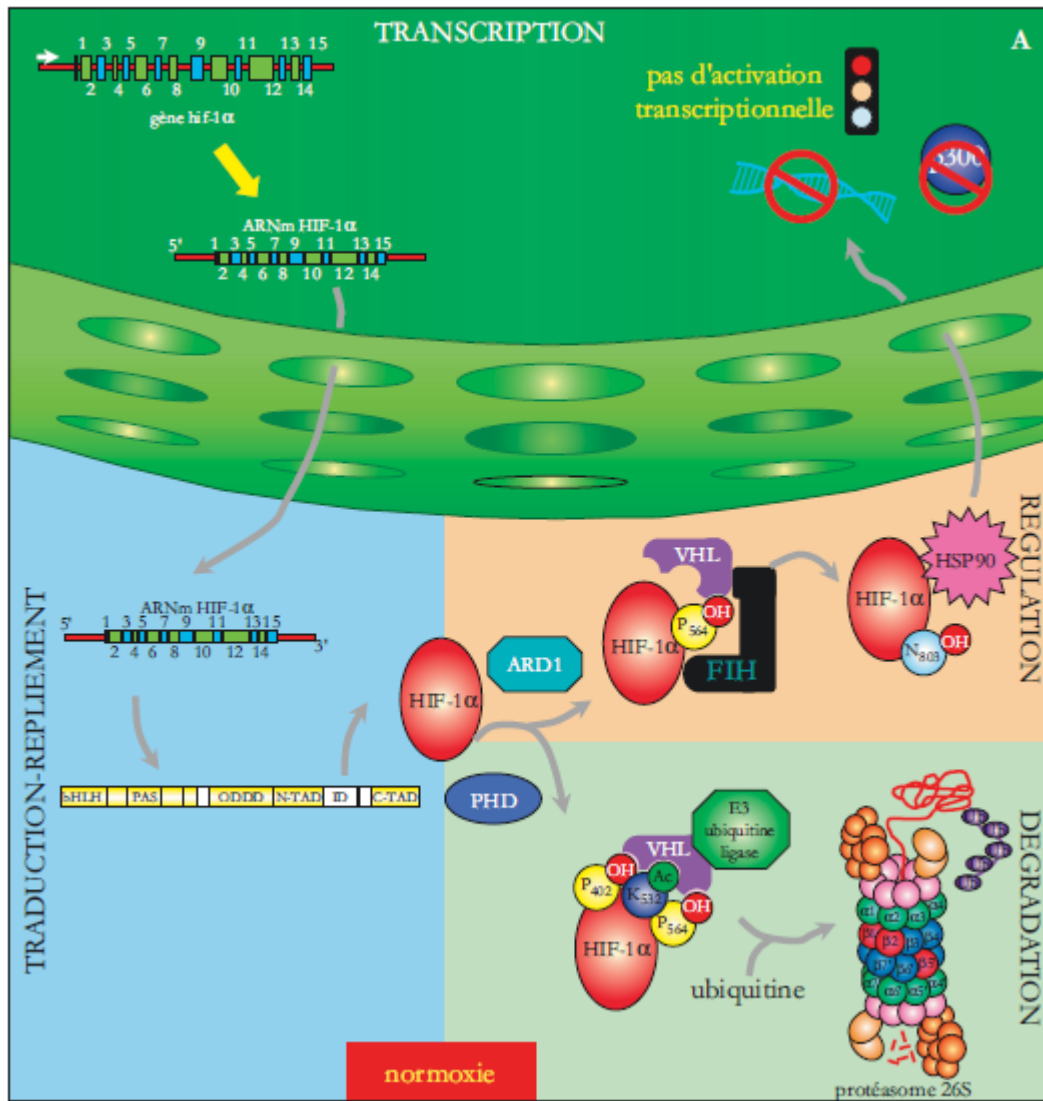
### 3.2 Ρύθμιση σηματοδοτικής οδού HIF-1a

Έχει αποδειχτεί ότι σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η HIF-1a εκφράζεται αλλά δεν είναι σταθερή. Παρατηρήθηκε ότι η HIF-1a υφίσταται τροποποίηση σε επίπεδο μετά την μεταγραφή. Πιο συγκεκριμένα, η HIF-1a υδροξυλιώνεται από μια οικογένεια ενζύμων με περιοχή προλυλ-υδροξυλάσης (PHDs – Prolyl Hydroxylase Domain Proteins) σε μία από τις δύο προλίνες της ODDD περιοχής (oxygen-dependent degradation domain ODDD).

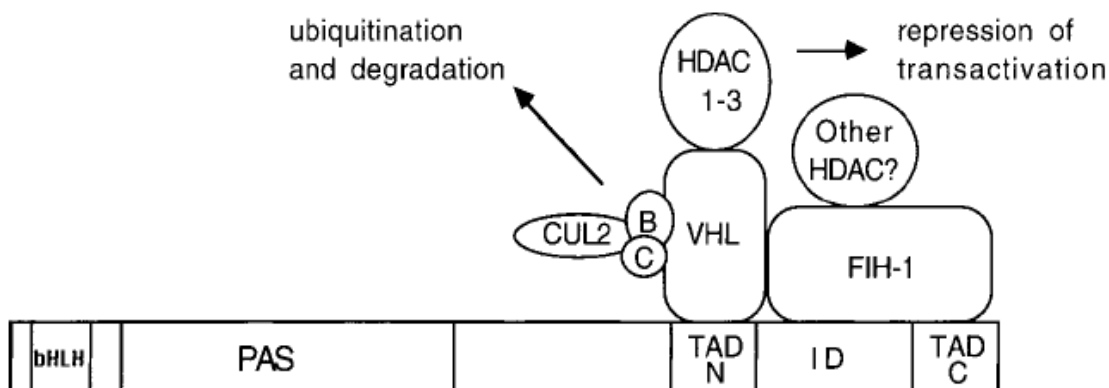
Έπειτα ακολουθεί γρήγορη αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού ουμπικουιτίνης – πρωτεασώματος. Τα ένζυμα PHDs για να είναι ενεργά χρειάζονται O<sub>2</sub>, συν-υπόστρωμα το 2-Οξογλουταρικό που είναι ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του κιτρικού οξέος, καθώς και FeII και ασκορβικό ως συμπαραγόντες (168)(169).

Οι υδροξυλιωμένες προλίνες κάνουν δυνατή την αναγνώριση της HIF-1α υπομονάδας από την πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (VHL) η οποία δρα ως E3 λιγάση ουμπικουϊνής της HIF-1α. Οπότε παρουσία επαρκούς ποσότητας οξυγόνου ο HIF1 δεν λειτουργεί (170).

Η έκφραση και η σταθεροποίηση του μονοπατιού HIF1 ελέγχεται μέσω της διαδικασίας αναστολή με ανάδραση, μιας και ο αναστολέας PHD2 ρυθμίζεται από τον HIF1. (Εικόνα 26)



**Εικόνα 26.** Οι υδροξυλάσες είναι ένζυμα που εξαρτώνται από το οξυγόνο. Για αυτό το λόγο σε συνθήκες υποξίας αυτά τα ένζυμα δεν μπορούν να δράσουν, οπότε και ο HIF-1α δεν υδροξυλιώνεται. Υπο φυσιολογικές συνθήκες παρατηρήθηκε ότι η δράση του HIF-1α ρυθμίζεται και στον πυρήνα.

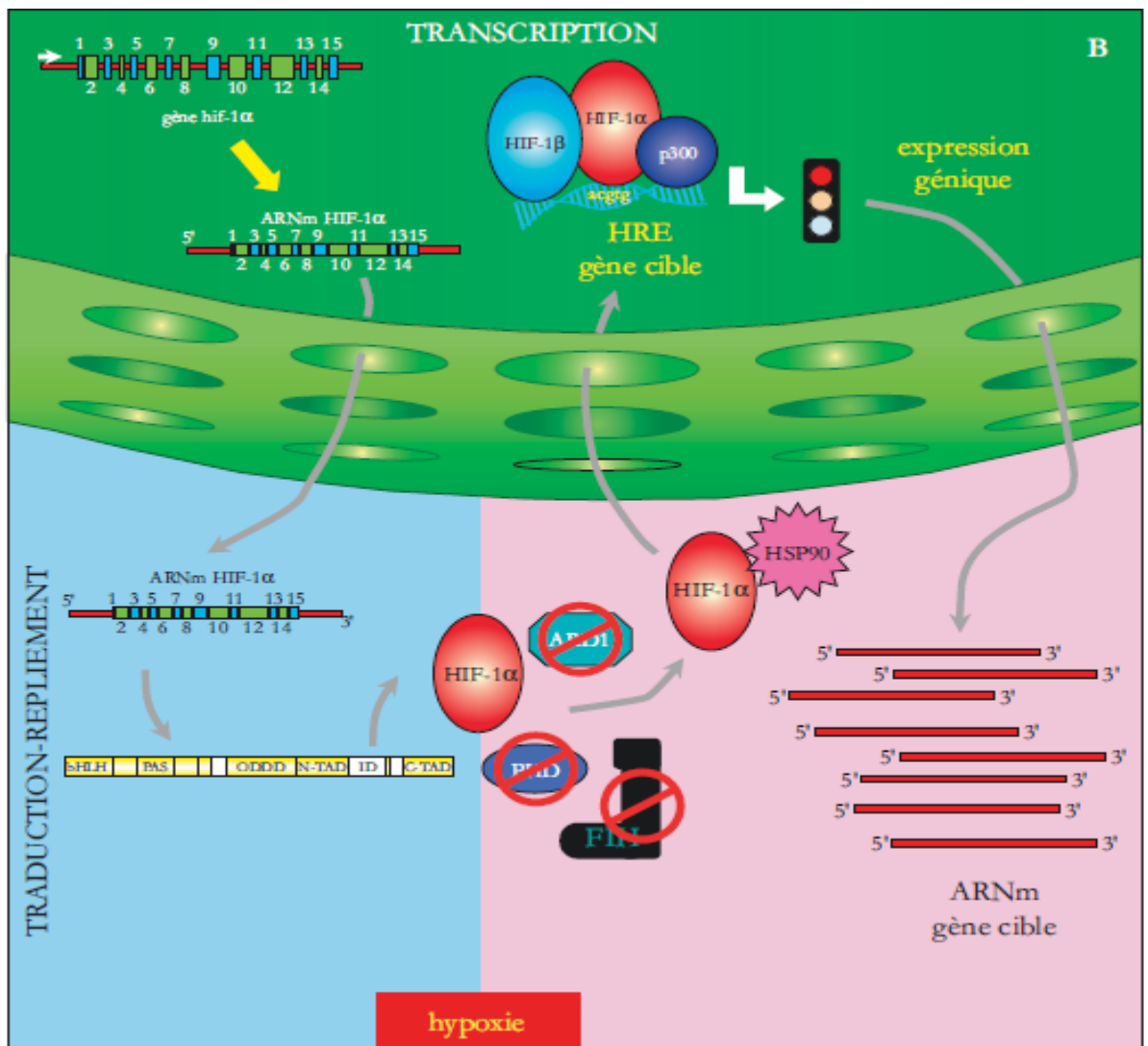


**Εικόνα 27.** Αρνητική ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης HIF-1a και της μεταγραφικής του δράσης από τον FIH1 σε φυσιολογικές συνθήκες

Στην απενεργοποίηση του μονοπατιού HIF1 σε φυσιολογικές συνθήκες συνεισφέρει μια πρωτεΐνη, ο παράγοντας που αναστέλλει τον HIF1 (FIH – Factor Inhibiting HIF1). Η πρωτεΐνη FIH είναι και αυτή μέλος των υδροξυλασών που εξαρτώνται από τον Fe (II) και 2-Οξογλουταρικό (2-Oxoglutarate OG). Ο FIH αλληλεπιδρά με τις περιοχές 757-826 του HIF-1a και πιο συγκεκριμένα υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στην κυτταροπλασματική περιοχή trans ενεργοποίησης της υπομονάδας HIF-1a (TAD-C), εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την αλληλεπίδραση αυτής της υπομονάδας με τους συν-ενεργοποιητές p300 και CBP (171)(172).

Κάτω από υποξικές συνθήκες ή συνθήκες μιμούμενες την υποξία, η πρωτεΐνη HIF1 είναι σταθερή και ενεργή μιας και οι υδροξυλάσες, οι πρωτεΐνες VHL και η FIH είναι ανενεργές λόγω της έλλειψης οξυγόνου.

Τα ένζυμα PHDs αναστέλλονται, δεν υδροξυλιώνουν την HIF-1a οπότε αυτή η υπομονάδα με τη σειρά της δεν αναγνωρίζεται από την VHL και άρα δεν αποδομείται από το πρωτεάσωμα. Το αποτέλεσμα είναι η HIF-1a να σταθεροποιείται, να εισέρχεται και να συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου ενώνεται με την HIF-1b, δημιουργούν διμερές και προσελκύει τον μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή p300/CREB σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο το ενεργό σύμπλοκο HIF. Το σύμπλοκο αυτό προσδένεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία 5'-(A/G) CGTG-3', HREs (HIF – Responsive elements) στοιχεία που αποκρίνονται στον HIF στον υποκινητή των γονιδίων στόχων (173)(174)(175). (Εικόνα 28)



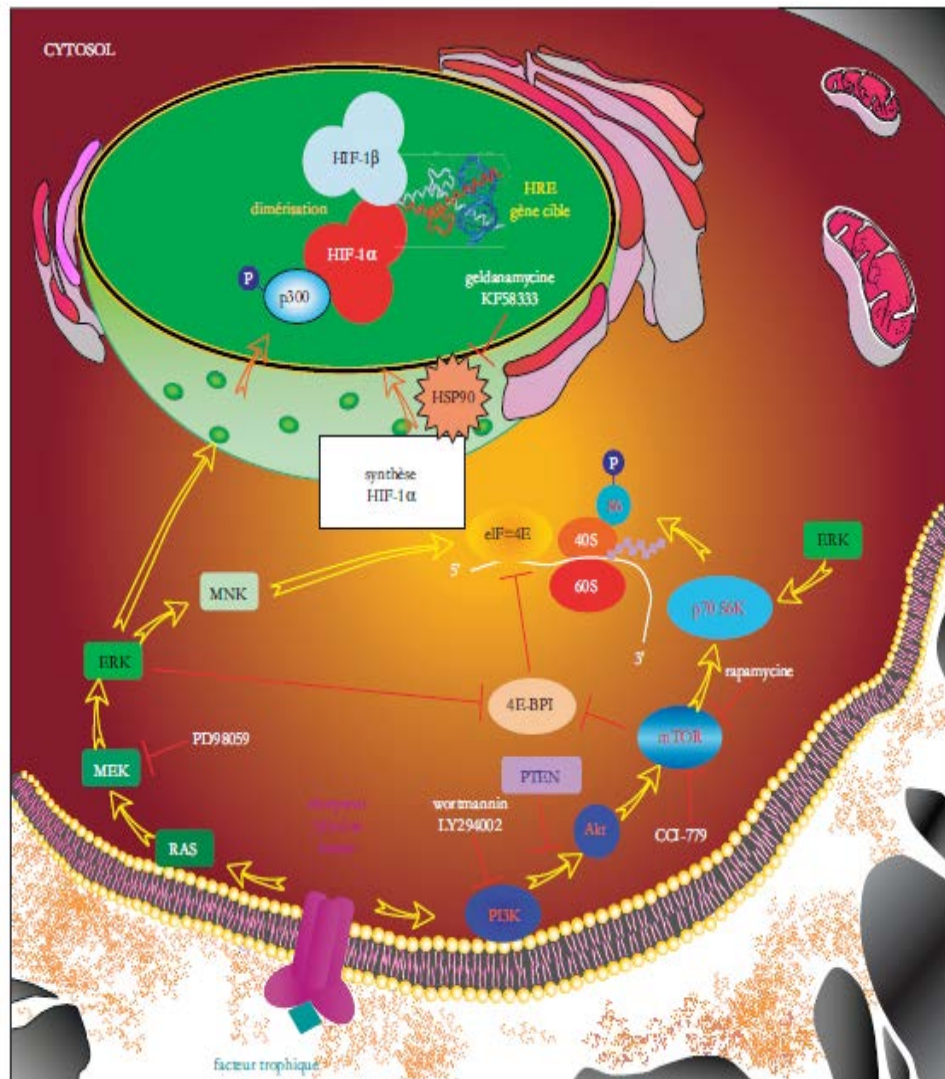
**Εικόνα 28.** Ρύθμιση της σύνθεσης της πρωτεΐνης HIF-1a ανεξάρτητα από την πίεση του οξυγόνου στο κύτταρο

Μια μεγάλη ποικιλία από ερεθίσματα του HIF1 δρουν ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση οξυγόνου. Αυτά τα ερεθίσματα είναι κυρίως πρωτεΐνες, που ρυθμίζουν την μετάφραση του HIF1. Η PKC (Protein Kinase C) αυξάνει το ρυθμό μεταγραφής της υπομονάδας HIF-1a και δρα σε συνδυασμό με το μονοπάτι PI3K (Phosphatidy Inositol 3 Kinase), το οποίο επίσης αυξάνει την μετάφραση του HIF1a. Το μονοπάτι PKC ενεργοποιεί την έκφραση της S6 ριβοσωμικής πρωτεΐνης, η οποία αναγνωρίζει με μεγάλη εξειδίκευση συγκεκριμένα mRNAs.

Μέσω της φωσφορυλίωσης της S6 πρωτεΐνης σε φυσιολογικές συνθήκες, οι ρυθμοί της μετάφρασης του mRNA του HIF-1a μπορούν να αυξηθούν σημαντικά,

αντισταθμίζοντας έτσι αποτελεσματικά την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα και αυξάνοντας τα επίπεδα του συμπλόκου HIF1 μέσα στο κύτταρο.

Το μονοπάτι PI3K έχει αναγνωριστεί ως πρωταρχικό μέσω του οποίου πολλοί μεσολαβητές, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες, επηρεάζουν την ενεργοποίηση του HIF-1a στα μυϊκά κύτταρα των αγγείων και στα μακροφάγα (176). (Εικόνα 29)



**Εικόνα 29.** Ενεργοποιημένα μονοπάτια

Η μετάφραση του HIF-1a μπορεί να επαχθεί από αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν το PI3K (phosphatidy inositol-3 kinase) – AKT – mTOR(mammalian Target of Rapamycin) καθώς και το MAPK (Mitogen – activated protein kinase) μονοπάτι. Στο MAPK μονοπάτι η κινάση ERK (Extracellular signal Reduced Kinase) ενεργοποιείται από την κινάση ERK. Η ERK

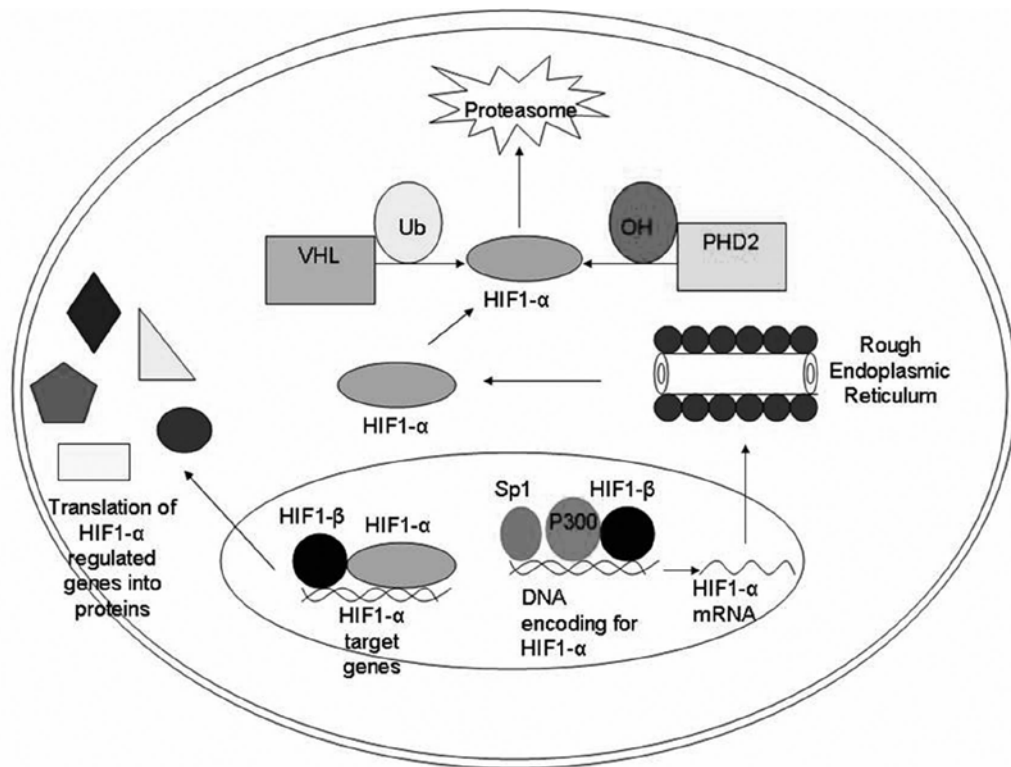
και η mTOR φωσφορυλιώνουν την p70 S6 κινάση. Μέσω της φωσφορυλίωσης της S6 πρωτεΐνης επηρεάζονται τα επίπεδα του HIF-1a (177).

Παρόλο που η υποξία θεωρείται το κύριο ερέθισμα για την δράση της HIF, ένας αριθμός άλλων μη υποξικών ερεθισμάτων, παραγόντων και οδών μετάδοσης μπορούν να επηρεάσουν εξίσου την λειτουργία της. Παραδόξως πολλοί από αυτούς τους παράγοντες και μεσολαβητές αποτελούν οι ίδιοι στόχους επαγωγής από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF. Τέτοιοι αναγνωρισμένοι παράγοντες που προάγουν την έκφραση της HIF, είναι ο πυρηνικός παράγοντας NF-κB, ο EGF, IGF. Επίσης απώλεια λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων (όπως p53) ή ενεργοποιητικές μεταλλάξεις ογκογονιδίων (όπως *ras*, *raf*, AKT) επηρεάζουν την λειτουργία και δράση της HIF.

### 3.3 HIF1 και γονίδια – στόχοι

Το μονοπάτι του HIF1 είναι πάρα πολύ σημαντικό γι' αυτό και εντοπίζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Ο HIF1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιόστασης, καθώς οι συγκεντρώσεις οξυγόνου αλλάζουν.

Εμπλέκεται στην εμβρυική ανάπτυξη, στην ανάπτυξη του καρκίνου, στη μετάσταση και στην απόπτωση (178)(179)(167). (Εικόνα 30)



**Εικόνα 30.** Μονοπάτι HIF-1 (Hypoxia- Inducible Factor). Το γονίδιο HIF-1a μεταγράφεται στον πυρήνα με τη βοήθεια των πρωτεϊνών Sp1 (Specificity Protein), P300 και HIF-1b. Από τη στιγμή που θα μεταφραστεί στο κυτταρόπλασμα το mRNA του HIF-1a και παραχθεί η πρωτεΐνη, αυτή μπορεί να υποστεί υδροξυλίωση και να αποδομηθεί από το πρωτεάσωμα. Αλλιώς σε συνθήκες υποξίας, μπορεί η πρωτεΐνη HIF-1a να ξαναμπει στον πυρήνα και να σχηματίσει σύμπλοκο με την υπομονάδα HIF-1b. Το τελικό διμερές σύμπλοκο δρα ώστε να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων – στόχων όπως του παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Η ευαισθησία της HIF-1a ρυθμίζεται από το ισοζύγιο αντιοξειδωτικών / προ – οξειδωτικών στο κύτταρο. Ένα αυξημένο επίπεδο ανηγμένης γλουταθειόνης (αντιοξειδωτικό τριπεπτίδιο γ-γλουταμυλ-κυστεϊνυλ-γλυκίνης) σχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα πρόσδεσης του HIF1 στο DNA. Από την άλλη, αυξημένες προοξειδωτικές συνθήκες αναστέλλουν αυτή την ενεργότητα (180).

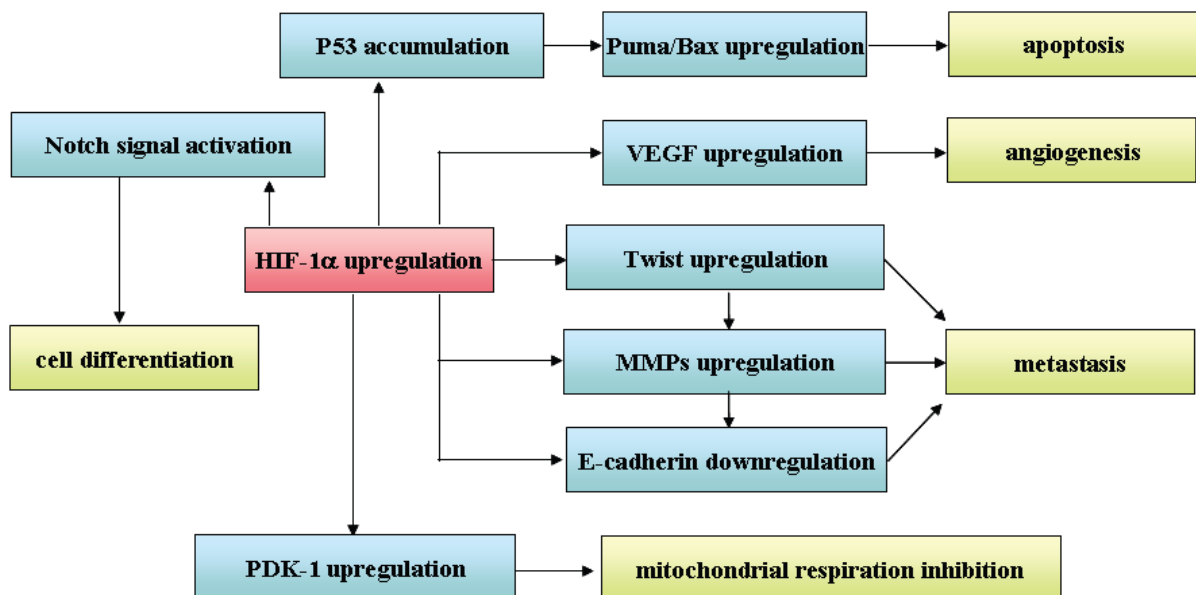
Ο HIF-1 δρα σαν βασικός ρυθμιστής της έκφρασης των γονιδίων που ελέγχονται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου. Περισσότεροι από 60 γονιδια-στόχοι του HIF έχουν ταυτοποιηθεί. Τα περισσότερα από αυτά ελέγχονται από την απευθείας αλληλεπίδραση του HIF με HREs που περικλείονται στην περιοχή του υποκινητή τους.

Ως μεταγραφικός παράγοντας ο HIF1 αναγνωρίζει και συνδέεται με τις αλληλουχίες 5'-(A/G) CGTG-3' που ονομάζονται στοιχεία αποκρινόμενα στην υποξία (HREs) και έτσι ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων.

Άλλα γονίδια βέβαια εκφράζονται σαν αποτέλεσμα έμμεσης ρύθμισης από δευτερογενείς καταρράκτες γονιδιακής ρύθμισης.

Ο HIF-1a στοχεύει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών και διαφορετικών λειτουργιών που σχετίζονται με τον καρκίνο. Όπως μεταφορά οξυγόνου, μεταβολισμό σιδήρου, γλυκόλυση, μεταφορά γλυκόζης, επιβίωση κυττάρων, πολλαπλασιασμός κυττάρων, αγγειογένεση και μετάσταση.

Σε πολλούς και διαφορετικούς τύπους καρκίνου διαπιστώθηκε υπερέκφραση της ρυθμιστικής υπομονάδας HIF-1a και αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με την αγγειογένεση, την σοβαρότητα του βαθμού κακοήθειας, μειωμένο ποσοστό επιβίωσης και αναποτελεσματικότητα των φαρμακευτικής αγωγής (181)(182). (Εικόνα 31)



**Εικόνα 31.** Γονίδια – στόχοι του HIF-1a και οι λειτουργίες τους

Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση του HIF-1a έχει συσχετιστεί με τη συγκέντρωση του p53 και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, που αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας HIF-1a παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου (183)(184)(185).



### 3.4 HIF-1a και καρκίνος ωοθηκών

Η αγγειογένεση και η κυτταρική απόκριση στην υποξία αποτελούν βήματα – κλειδιά στην εξέλιξη του καρκίνου (186). Αυτό συμβαίνει γιατί η περιορισμένη ικανότητα διάχυσης του O<sub>2</sub> δεν επιτρέπει στον όγκο να αναπτυχθεί και απαιτεί νεοαγγειογένεση (187). Επίσης ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων μπορεί να ξεπεράσει το ρυθμό της αγγειογένεσης, οπότε τα καρκινικά κύτταρα θα πρέπει να προσαρμοστούν στις συνθήκες υποξίας.

Η υποξία είναι ένα σύνηθες χαρακτηριστικό για τους στερεούς όγκους (182). Είναι μια κατάσταση στην οποία τα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα στερούνται οξυγόνου λόγω περιορισμένης παροχής σε αυτά αίματος ως αποτέλεσμα της μη – φυσιολογικής μικροαγγείωσης του όγκου. Η υποξία δημιουργεί δύο (2) σημαντικά επακόλουθα. Καταρχάς προκαλεί νέκρωση των κυττάρων καθώς και ενεργοποίηση του HIF-1a στα καρκινικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του HIF-1a οδηγεί στην έκφραση χιλιάδων γονιδίων, πολλά από τα οποία ευθύνονται για την εξέλιξη του καρκίνου.

Η ενεργοποίηση του HIF-1 μπορεί να προκαλέσει θετική και αρνητική ρύθμιση για ένα σύνολο γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες που επιτρέπουν το κύτταρο να ανταπεξέλθει σε στρεσογόνες καταστάσεις σε ιστούς υπό κατάσταση υποξίας.

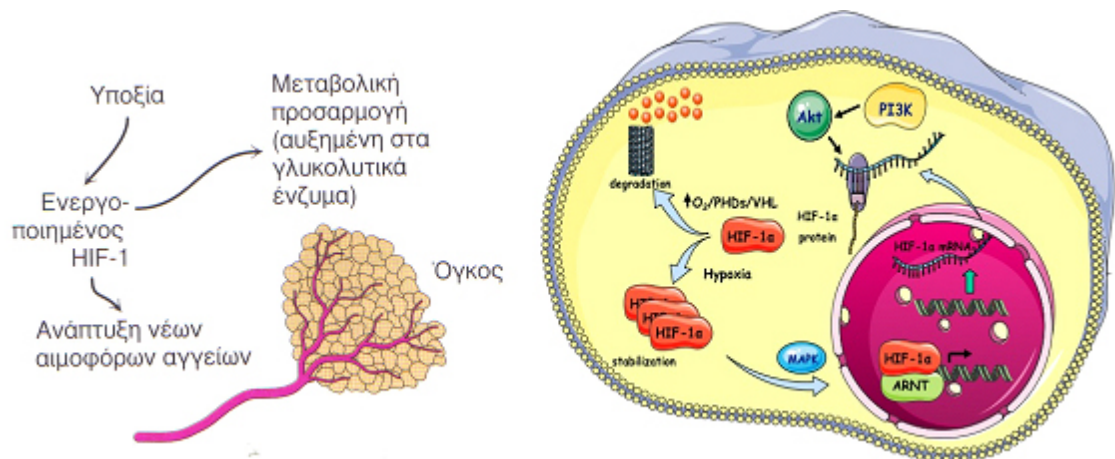
Η υπομονάδα HIF-1a μπορεί να αυξήσει τη διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> ή την προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού στην έλλειψη οξυγόνου επηρεάζοντας έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου όπως την ερυθροποιητίνη, την ενδοθηλίνη-1, γλυκολυτικά ένζυμα, μεταφορείς γλυκόζης καθώς και άλλους παράγοντες.

Επίσης ο HIF-1a μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς και τον ρυθμό απόπτωσης. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υποξία και υπογλυκαιμία μειώνουν τον πολλαπλασιασμό και αυξάνουν την απόπτωση σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα με κανονική έκφραση HIF-1a αλλά όχι σε κύτταρα που ο HIF-1a είναι ανενεργός. Αυτό η ερευνητική ομάδα το εξήγησε με βάση το γεγονός ότι τα γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο p53, p21 και bcl-2 βρέθηκε να εξαρτώνται από τον HIF1a.

Ένας μεγάλος αριθμός από πολλά και διαφορετικά μονοπάτια είτε φυσιολογικά είτε παθολογικά μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι του HIF1. Πολλοί αυξητικοί παράγοντες όπως ινσουλίνη, EGF – Epidermal Growth Factor, μαζί με τα

ογκογονίδια Ras και Myc ενεργοποιούν το μονοπάτι του HIF. Επίσης μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53, pVHL επίσης οδηγούν σε επαγωγή και πολλαπλασιασμό του μονοπατιού HIF (186).

Βέβαια η κατάσταση υποξίας δεν αποτελεί μόνο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για πολλούς καρκινικούς τύπους αλλά αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα και για την επιτυχία της χημειοθεραπείας. (Εικόνα 32)



**Εικόνα 32.** Ο HIF-1a σε συνθήκες υποξίας προάγει την αγγειογένεση μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με αυτήν

Η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου. Αποδείχτηκε ότι ο HIF1 επάγει την αγγειογένεση ενεργοποιώντας την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πολλούς αυξητικούς παράγοντες, όπως τον VEGF (vascular endothelial growth factor).

Η έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1a στον καρκίνο των ωθηκών μελετήθηκε για πρώτη φορά με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη HIF-1a υπερεκφράζεται στους καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς ωθηκών (94).

Σε μια άλλη μελέτη και πάλι με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας μελετήθηκε η σχέση της έκφρασης του HIF-1a με την πρόγνωση και με την απόκριση στη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο ωθηκών. Διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση του HIF-1a από μόνη της δεν έχει καμία επίπτωση στην πρόγνωση του καρκίνου των ωθηκών. Από την άλλη σε μια υποομάδα ασθενών που

υπήρξε ταυτόχρονη υπερέκφραση της HIF-1a και του p53, ο μέσος ρυθμός επιβίωσης ήταν μικρότερος (188)(183).

Επίσης μελετήθηκε η έκφραση του HIF-1a σε τέσσερις (4) καρκινικές κυτταρικές σειρές ωοθηκών (SKOV3, A2780, A2780/cDDP, OVCAR3). Βρέθηκε ότι και στις τέσσερις (4) καρκινικές κυτταρικές σειρές ο HIF-1a εκφράζονταν και σε συνθήκες φυσιολογικές και σε συνθήκες υποξίας. Αλλά σε συνθήκες υποξίας η έκφρασή του ήταν πολύ υψηλότερη. Αντίθετα στη φυσιολογική κυτταρική σειρά OSE δεν ανιχνεύτηκε ο παράγοντας HIF-1a ούτε σε φυσιολογικές συνθήκες, ούτε σε συνθήκες υποξίας. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν την ερευνητική ομάδα στο συμπέρασμα ότι στον καρκίνο των ωοθηκών η υψηλότερη έκφραση του HIF-1a μπορεί να αποτελεί χαρακτηριστικό της κακοήθειας (184).

Υπήρξε μία ακόμη μελέτη που απέδειξε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της έκφρασης του HIF-1a και της πρόγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών. Παρατηρήθηκε ότι σε 52 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών σταδίου III/IV από τους οποίους χειρουργικά αφαιρέθηκε ο όγκος και μετά το χειρουργείο υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία με paclitaxel, carboplatin (TC), η έκφραση του HIF-1a σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών (189).

Γενικά παρά το ότι έχει αποδειχθεί η υπερέκφραση του HIF-1a σε κακοήθεις όγκους των ωοθηκών, η προγνωστική του σημασία στο νόσημα αυτό παραμένει αμφιλεγόμενη (190).

Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας αποτελεί το επίκεντρο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος καθώς η έκφρασή του συσχετίζεται άμεσα με κακή πρόγνωση σε πολλά είδη καρκίνων και η καταστολή της δράσης του αποτελεί στόχο πληθώρας φαρμακευτικών προσεγγίσεων.

## *Κεφάλαιο 4 Ο άξονας NEP/Νευροπεπτιδίων*

### *4.1 Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση NEP*

Η πρωτεόλυση κατέχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο. Με τον όρο πρωτεόλυση ή πρωτεϊνόλυση (proteolysis) χαρακτηρίζεται στη Βιοχημεία το σύνολο των αντιδράσεων αποδόμησης των συμπλόκων πρωτεϊνικών ουσιών. Η διάσπαση αυτή των μορίων της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών τους. Στο ζωντανό κύτταρο η πρωτεϊνόλυση εξασφαλίζεται από

ειδικά ένζυμα που ονομάζονται πρωτεολυτικά ένζυμα (ενδοπεπτιδάσες και εξωπεπτιδάσες). Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί πάνω από 300.000 πεπτιδάσες πολλές από τις οποίες δεν έχουν ακόμα μελετηθεί.

Η NEP είναι (ή αλλιώς γνωστό ως CD10, MME, EC 3.4.24.11, CALLA) μια μεταλλοπεπτιδάση που είναι μέλος της M13 οικογένειας στην οποία ανήκουν και τα ένζυμα που μετατρέπουν την ενδοθηλίνη (ECE-1 και ECE-2), το KELL, το PEX, το ΧCE, το DINE και το NEPII (191). Κάποια από τα παραπάνω αποτελούν πολύτιμους θεραπευτικούς στόχους, ειδικά τα ένζυμα που μετατρέπουν την ενδοθηλίνη (ECE-1 και ECE-2). Η NEP είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη, άφθονη στο νεφρό με παρόμοια εξειδίκευση με αυτή του βακτηριακού ενζύμου θερμολυσίνη.

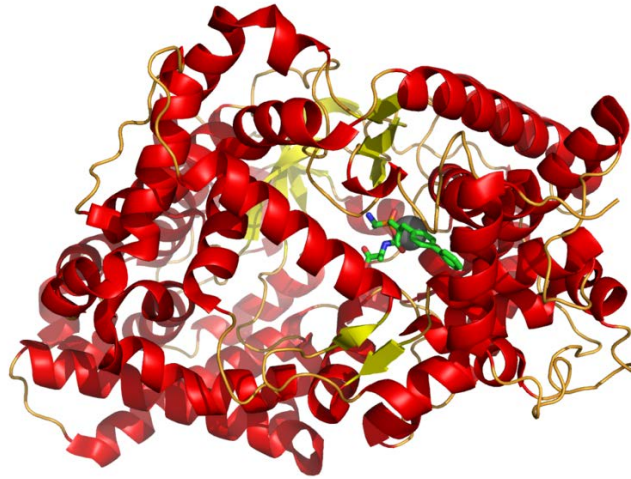
Ο πίνακας που ακολουθεί αποτελεί μία σύγκριση NEP και ECE-1 (192). (Εικόνα 33)

Characteristics	NEP	ECE
Subunit <i>M<sub>r</sub></i> (kDa)	90–100	120–130
Oligomeric structure	Noncovalent dimer (most species)	Disulfide-linked dimer
Topology	Type II membrane glycoprotein	Type II membrane glycoprotein
Human chromosomal location	3q21-q27	1p36.1
Specificity	—○—●— (● = hydrophobic)	Trp <sup>21</sup> —↓—Val/Ile <sup>22</sup> (of big ETs)
Cell compartment	Plasma membrane	Plasma membrane (Golgi?)
Localization (major sites)	Renal proximal tubule and glomeruli; small intestine; placenta; choroid plexus; striatonigral neurones; Schwann cells; testis (Leydig cells); ovary; gonadotrophic cells; adrenal cortex; pre-B lymphocytes; granulocytes	Endothelial cells of aorta, lung, kidney, liver, heart. Adrenal gland; pancreatic islets; testis (interstitial cells); brain

**Εικόνα 33.** Πίνακας σύγκρισης NEP και ECE-1

#### 4.2 Φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες της NEP

Η NEP ως μια κλασική μέταλλο-πεπτιδάση περιέχει μια HexxH ψευδάργυρο-εξαρτώμενη δομή και μια καλά διατηρούμενη ακολουθία ExxA/GD στην οποία η γλουταμίνη υπηρετεί το τρίτο υπόστρωμα ψευδαργύρου. Απομόνωση και επακόλουθη κλωνοποίηση της NEP αποκάλυψε ότι είναι μία επιφανειακή 90-110kDa πεπτιδάση, τύπου II που αποτελείται από τρεις βασικές δομές: μία αμινοτελική (N-άκρο) κυτταροπλασματική δομή, μία υδρόφοβη διαμεμβρανική δομή και μία μεγάλη εξωκυττάρια δομή που εμπεριέχει και το ενεργό της κέντρο. (193) (Εικόνα 34)



**Εικόνα 34.** Η δομή του εξωκυττάριου τμήματος της NEP σε σύμπλεγμα με αναστολέα προσδεμένο στο άτομο ψευδαργύρου. Το άτομο ψευδαργύρου απεικονίζεται ως γκρι σφαίρα και ο αναστολέας με πράσινο χρώμα.

Η πρωτεΐνη περιέχει 12 μόρια κυστεΐνης, 4 από τα οποία περιέχονται στα 32 πρώτα αμινοξέα που έπονται του διαμεμβρανικού κομματιού και ενδέχεται να συμμετέχουν στους δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η HexxH ψευδάργυρο-εξαρτώμενη δομή, τυπική πολλών μεταλλοπεπτιδασών βρίσκεται στο καρβοξυτελικό (εξωκυττάριο) τμήμα της πρωτεΐνης. Το υπεύθυνο γονίδιο για τη σύνθεση της NEP βρίσκεται σε ένα αντίγραφο, αποτελείται από 24 εξόνια και είναι αρκετά συντηρημένο στα διάφορα είδη των θηλαστικών (194). Το γονίδιο βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 3q21-q27 (195). Τρία (3) διακριτά mRNAs έχουν βρεθεί στον άνθρωπο που διαφέρουν μόνο στις (πέντε) 5' αμετάφραστες περιοχές υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο ότι η έκφραση της NEP ελέγχεται από το είδος του ιστού και το στάδιο ανάπτυξης (196).

Το πλήθος υποστρωμάτων της NEP και η αναστολή της δράσης της από φωσφοραμιδίνη υπέδειξαν την ομοιότητά της με το ενεργό κέντρο της θερμολυσίνης. Παρόλη την περιορισμένη ομολογία τους στην αμινοξική ακολουθία, τα περισσότερα αμινοξέα που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο της θερμολυσίνης ταυτοποιήθηκαν με κρυσταλλογραφία και βρέθηκε ότι είναι όμοια με αυτά του ενεργού κέντρου της NEP. Πολλά αμινοξέα της NEP σχετίζονται με την πρόσδεση ψευδαργύρου και την κατάλυση ή την πρόσδεση στο υπόστρωμα. Αυτά περιλαμβάνουν δύο (2) αμινοξέα, His<sup>583</sup> και His<sup>587</sup> στην HexxH ψευδάργυρο-εξαρτώμενη δομή της NEP και ένα αμινοξύ Glu<sup>584</sup> που συμμετέχει στην κατάλυση.

Το αμινοξύ Asp<sup>650</sup> είναι επίσης σημαντικό για την ικανότητα υδρόλυσης της NEP. Τα αμινοξέα Arg<sup>102</sup> και Arg<sup>747</sup> για την πρόσδεση στο υπόστρωμα και στον αναστολέα (192). Πολύ πρόσφατα ένα αμινοξύ ασπαραγίνης (Asn<sup>542</sup>) βρέθηκε να συμμετέχει στην πρόσδεση της NEP στο υπόστρωμα μέσω ενός μοναδικού υδρογονικού δεσμού.

Τα βιολογικά και ρυθμιστικά αποτελέσματα της NEP είναι αποτέλεσμα της ενζυμικής δραστηριότητας της πεπτιδάσης. Παρόλα αυτά μελέτες έχουν δείξει ότι η NEP έχει και άλλες βιολογικές ιδιότητες εκτός από την ικανότητα της να απενεργοποιεί υποστρώματα νευροπεπτιδίων. Δηλαδή η NEP από μόνο της επηρεάζει τη μεταγωγή σημάτων που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση (193).

#### *4.3 NEP και καρκίνος ωοθηκών*

Η πρωτεΐνη CD10 μπορεί να εξυπηρετήσει στη διαφοροδιάγνωση του πρωτοπαθούς διαυγοκυτταρικού καρκινώματος (clear cell carcinoma) από ένα μεταστατικό καρκίνωμα νεφρού. Αυτό συμβαίνει καθώς όλα τα αδενώματα της ωοθήκης δεν εκφράζουν CD10 ενώ αντίθετα τα καρκινώματα του νεφρού είναι CD10 θετικά (197). Ερευνητές έχουν δείξει ότι η NEP εκφράζεται στα στρωματικά κύτταρα της οριακής κακοήθειας και των κακοήθων όγκων ωοθήκης αλλά όχι στα αδενώματα που συγκρίνονται μόνο με τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα. Ωστόσο η NEP εκφράζεται τόσο από τα στρωματικά κύτταρα όσο και από τα καρκινικά σε όγκους ωοθηκών (195). Συνεπώς η έκφραση CD10 είναι αντιστρόφως ανάλογη με το βαθμό κακοήθειας του όγκου υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη CD10 μπορεί να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση του όγκου όπως έχει δείχθει στα καρκινώματα του ενδομητρίου (194)(198).

Η NEP αποδομεί πλήθος ενεργών πεπτιδίων και κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της ενδοθηλίνης-1, εγκεφαλίνης και βομβεσίνης. Συνεπώς η βιολογική δραστηριότητα αυτών των υποστρωμάτων ρυθμίζεται από την NEP μέσω μείωσης των συγκεντρώσεών τους που είναι διαθέσιμες για πρόσδεση στον υποδοχέα και μεταγωγή σήματος. Υπερέκφραση της NEP σε συνδυασμό με αντίστοιχη μείωση της ενδοθηλίνης-1 μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών.

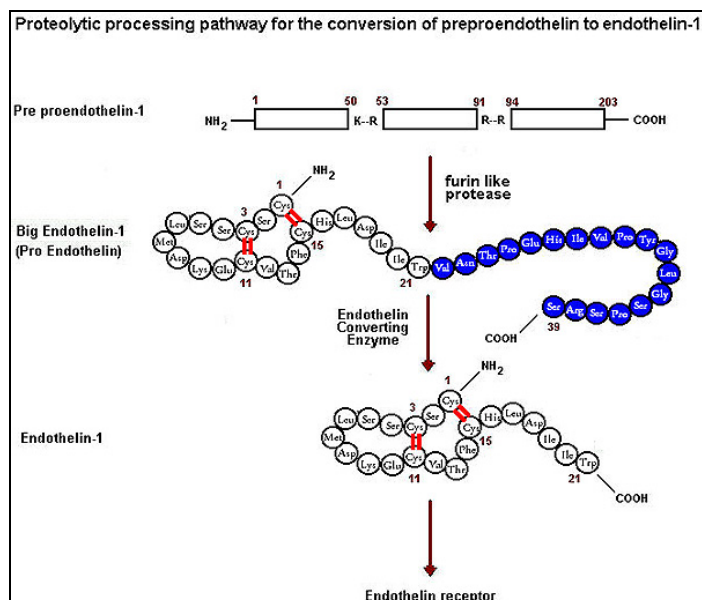
Μελέτες σε κυτταρικές σειρές ωοθηκών επιβεβαιώνουν τα ανωτέρω αποτελέσματα καθώς προσθήκη NEP σε καρκινικά κύτταρα ωοθήκης μείωσε σε

σημαντικό βαθμό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπρόσθετα προσθήκη ανασυνδυασμένης ενδοθηλίνης σε SKOV3 κύτταρα ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό ο οποίος αναστάληκε τελείως από τη χρήση ανταγωνιστή ET<sub>A</sub>R, το TAK-044. Αντίθετα καμία επίδραση δεν είχε η προσθήκη ενδοθηλίνης στον πολλαπλασιασμό των SKNEP3 κυττάρων. Η συγκέντρωση ενδοθηλίνης στο υπερκείμενο ήταν σημαντικά μικρότερη στα SKOV3 κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν NEP. Τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι η NEP επηρεάζει άμεσα τις συγκεντρώσεις της ET-1 μέσω της ενζυμικής της δραστηριότητας (195).

#### *4.4 Νευροπεπτίδια – Ενδοθηλίνη*

##### *4.4.1 Δομή και λειτουργία*

Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), ενδοθηλίνη-2 (ET-2) και ενδοθηλίνη-3 (ET-3) είναι νευροπεπτίδια που εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και σε άλλους τύπους επιθηλιακών κυττάρων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ET-1, ET-2 και ET-3 βρίσκονται στα χρωμοσώματα 6, 1 και 20 αντίστοιχα. Η έκφραση της ET-1 προσδιορίζεται αρχικά από τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου που ρυθμίζονται από μία περιοχή εκκινητή, ανοδικά (5') του γονιδίου της προ-ενδοθηλίνης. Μία περιοχή πρόσδεσης GATA ρυθμίζει τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου. Το ώριμο πεπτίδιο της ET-1 προκύπτει μετά από ενζυμική κατεργασία του αρχικού προϊόντος του γονιδίου της προ-προενδοθηλίνης. Πιο συγκεκριμένα η προενδοθηλίνη -1 αρχικά μετατρέπεται σε ένα μεγάλο πεπτίδιο 39 αμινοξέων προενδοθηλίνης-1 και στη συνέχεια με μία διαδικασία πρωτεόλυσης μεταξύ των αμινοξέων Trp<sup>21</sup> και Val<sup>22</sup> μετατρέπεται στο ώριμο πεπτίδιο της ET-1, 21 αμινοξέων. Η διαδικασία της πρωτεόλυσης καταλύεται αρχικά από πρωτεάσες τύπου φουρίνης και σε δεύτερο στάδιο από τη μεμβρανική μεταλλοπρωτεάση ECE-1 (endothelin-converting enzyme-1) Πρόσφατα ένα νέο πεπτίδιο ενδοθηλίνης-1 με 31 αμινοξέα έχει ανιχνευτεί στον άνθρωπο. Το προϊόν αυτό έχει χαρακτηριστεί ως ενδοθηλίνη<sub>1-31</sub> (199). (Εικόνα 35)



**Εικόνα 35.** Το μονοπάτι πρωτεόλυσης για την μετατροπή της προ-προενδοθηλίνης σε ενδοθηλίνη 1.

#### 4.4.2 Ενδοθηλίνη και ο ρόλος της στην ωοθυλακιορρηξία και στη φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών

Σε μελέτη φάνηκε, μέσω υβριδισμού, παρουσία mRNA ενδοθηλίνης-1 στη στοιβάδα κοκκιωδών κυττάρων αλλά όχι στα κύτταρα της θήκης. Παρόλα αυτά όπως ήταν αναμενόμενο, ET-1 mRNA ανιχνεύθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων ανάμεσα στα κύτταρα της θήκης (200). Μελετώντας την έκφραση του γονιδίου της ET-1 στα ωοθυλάκια ο Flores έδειξε αύξηση της έκφρασης όσο τα ωοθυλάκια πλησιάζουν προς την ωοθυλακιορρηξία και απότομη μείωση μετά την ωοθυλακιορρηξία (201). Συμπερασματικά η ενδοθηλίνη-1 κατέχει ένα ρόλο στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου και ενδεχομένως στην αναστολή πρόωρης ωχρινοποίησης των κοκκιωδών κυττάρων (202).

Το ωχρό σωματίο είναι ένας ιστός με υψηλή αγγείωση και το 50% των κυττάρων στον ώριμο αδένα είναι ενδοθηλιακά κύτταρα (203) (204). Ωστόσο το ωχρό σωματίο δεν αποτελεί μόνο ένα σημαντικό μέρος για τη σύνθεση ενδοθηλίνης αλλά και τα επίπεδά της είναι ορμονοεξαρτώμενα καθόλη τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου (205)(206). Η ανίχνευση του πεπτιδίου της ενδοθηλίνης ήταν υψηλότερη στις ημέρες 17-21 του κύκλου (30 φορές υψηλότερη από τις ημέρες 5-6) (207)(208). Ο Ohtani παρατήρησε τα υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων ενδοθηλίνης σε δείγματα περιφερικού αίματος κατά τη διάρκεια



της ωχρινόλυσης (209). Η διέγερση της έκφρασης ET-1 όπως περιγράφηκε παραπάνω πυροδοτείται από την προσταγλανδίνη F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), την ορμόνη της ωχρινοποίησης που εκκρίνεται σε αυτό το στάδιο. Πλήθος *in vivo* και *in vitro* μελετών έκτοτε επιβεβαίωσε την αύξηση των επιπέδων mRNA και πεπτιδίων της ενδοθηλίνης-1 με προσθήκη PGF<sub>2α</sub> (207) (210) (211). Αξίζει τα σημειωθεί ότι το πρόωρο ωχρό σωματίο που είναι PGF<sub>2α</sub>-ανεξάρτητο, χορήγηση προσταγλανδίνης δεν οδήγησε στην αύξηση επιπέδων ET-1 ούτε πυροδότησε αναστολή της ωχρινοποίησης (210)(212).

Η αύξηση των επιπέδων ET-1 κατά την ωχρινοποίηση μπορεί να συμμετέχει στον τερματισμό παραγωγής προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο. Πιο συγκεκριμένα όταν χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχοι ιστοί διαφόρων θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, αποδείχθηκε ότι η ET-1 δρώντας μέσω του υποδοχέα ET<sub>A</sub>R ανέστειλε τη βιοσύνθεση προγεστερόνης που διεγείρονταν από LH (luteinizing hormone) / hCG (human Chorionic Gonadotropin) (205) (206) (213) (214).

Σε δυο (2) δημοσιεύσεις φάνηκε ότι η ET-2 προκαλεί τη ρήξη του ωοθυλακίου κατά την ωοθυλακιορρηξία (215)(216). Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA της ET-2 αυξήθηκαν ραγδαία 12 ώρες μετά τη χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης ενώ μειώθηκαν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα 16 ώρες μετά. Η αύξηση της έκφρασης συνέπεσε με τη ρήξη του ωοθυλακίου. Η έκφραση του mRNA της ET-2 επιβεβαιώθηκε στα στρωματικά κύτταρα των ζώων στα οποία έχουν χορηγηθεί hCG, ενώ καθόλου έκφραση δεν παρατηρήθηκε στα άλλα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Το γεγονός ότι η ET-2 κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρήξη του ωοθυλακίου επιβεβαιώθηκε από τη χρήση μη εκλεκτικού ανταγωνιστή της ενδοθηλίνης όπου παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση στον αριθμό των ωοκυττάρων που απελευθερώθηκαν (215)(216).

Το ένζυμο μετατροπής σε ενδοθηλίνη ECE-1 πρώτα απομονώθηκε από αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η δράση του αναστέλλεται από τη φωσφοραμιδίνη, κοινό αναστολέα ECE και NEP ή εξειδικευμένο αναστολέα της ECE τον CGS35066 αλλά όχι άλλους εξειδικευμένους αναστολείς της NEP. Δομικά η ECE-1 διαμεμβρανικό διμερές 758 αμινοξέων ενωμένα με μία μοναδική δισουλφιδική γέφυρα. Η ECE-1 ανήκει στην οικογένεια των ουδέτερων μεταλλοπρωτεασών όπως η NEP. Ωστόσο, η ECE-1 είναι η μοναδική πρωτεΐνη αυτής της ομάδας και μία άλλη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της προ-ενδοθηλίνης μεταξύ των

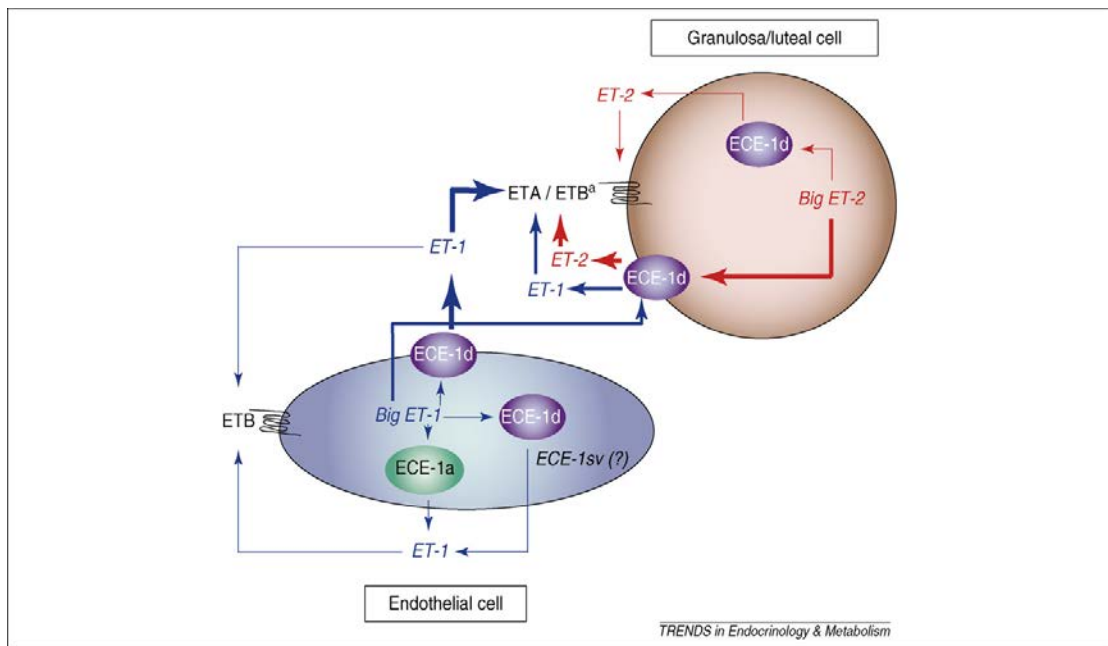
αμινοξέων His<sup>27</sup> και Gly<sup>34</sup> επιπρόσθετη του σημείου πρωτεόλυσης 21 και 22. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ECE-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (217).

Αναλύσεις με *in situ* υβριδισμό οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τόσο τα κύτταρα της στεροειδογένεσης όσο και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων και των ωχρών σωματίων εξέφραζαν ECE-1 mRNA. Η εκτεταμένη παρουσία της ECE-1 απαιτείται για την ωρίμανση και ενεργοποίηση των πρόδρομων μορφών της ενδοθελίνης 1 και 2. Επιπλέον εξασφαλίζει ότι οι ενδοθελίνες που έχουν μικρή διάρκεια ζωής, παράγονται γρήγορα στο αντίστοιχο μικροπεριβάλλον.

Χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους ανίχνευσης, βρέθηκε ότι όσο ωριμάζει το ωχρό σωματίο αυξάνεται η έκφραση και δραστηριότητα της ECE-1. Επιπρόσθετα, ECE-1 mRNA αυξήθηκε κατά τη μετάβαση του ωχρού σωματίου από την πρώιμη στην όψιμη φάση ωχρινοποίησης (208) (218). Η αύξηση των επιπέδων ECE-1 (mRNA και πρωτεΐνης) οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα ενδοθελίνης-1 και μείωση των επιπέδων προ-ενδοθελίνης.

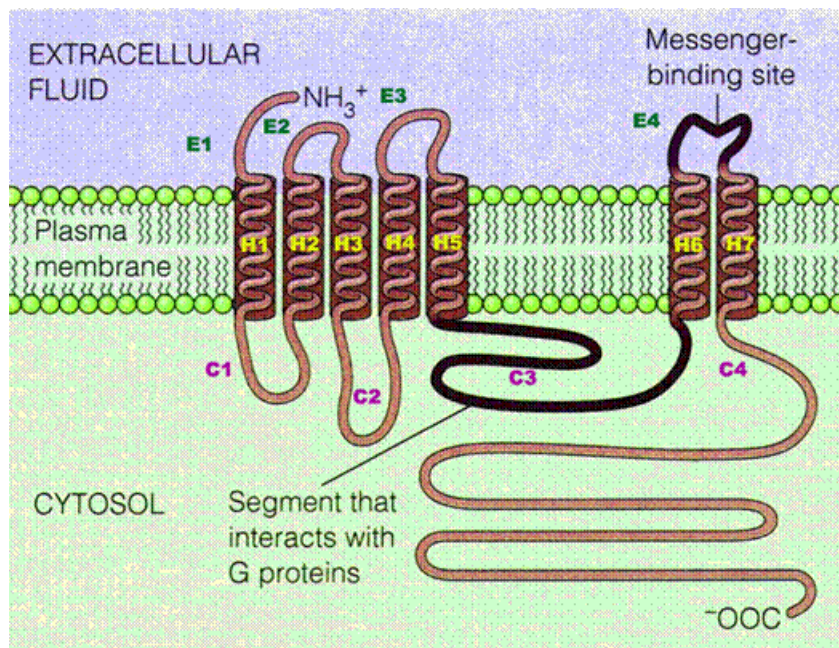
#### *4.4.3 Η κατανομή των ισομορφών της ECE-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα της ωοθήκης και τα κύτταρα της στεροειδογένεσης*

Παρόλο που και οι τέσσερις ισομορφές της ECE-1 είναι παρούσες στα κοκκίωδη κύτταρα, η ισομορφή 1<sup>a</sup> απουσιάζει από τα ωοθυλακικά και τα κύτταρα στεροειδογένεσης του ωχρού σωματίου. Η ισομορφή ECE-1d παρόλο που έχει μία μοναδική κατανομή ενδοκυττάρια, βρέθηκε να είναι ο πιο άφθονος τύπος τόσο σε ενδοθηλιακά αλλά και κύτταρα στεροειδογένεσης. Καινούριες μορφές της ECE-1 που στερούνται των διαμεμβρανικών τμημάτων βρίσκονταν σε μεγαλύτερη ποσότητα στα ενδοθηλιακά σε σχέση με τα κύτταρα στεροειδογένεσης (219) γεγονός που υποστηρίζει την ύπαρξη εναλλακτικού μηχανισμού ματίσματος ανάλογα με το είδος του κυττάρου. Η κατανομή των ισομορφών της ECE-1 είναι σημαντική καθώς προσδιορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα των ενδοθελινών (Εικόνα 36).



**Εικόνα 36.** Η παραγωγή ενδοθηλινών στην ωθήκη. ECE-1a, εκφράζεται αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και εντοπίζεται ενδοκυττάρια. Η ECE-1d η κύρια ισομορφή της ECE-1 τόσο σε ενδοθηλιακά όσο και κύτταρα στεροειδογένεσης (κοκκιώδη), είναι παρούσα στην πλασματική μεμβράνη και στο ενδοσωμικό σύστημα. Προ-ενδοθηλίνη-1 και προ-ενδοθηλίνη-2 παράγονται σε ενδοθηλιακά και κύτταρα στεροειδογένεσης αντίστοιχα μπορούν να ωριμάσουν από την ECE-1 που βρίσκεται τόσο στο κύτταρο παραγωγής τους όσο και σε ένα γειτονικό κύτταρο. Όσο και τα δύο είδη κυττάρων εκφράζουν υποδοχείς ενδοθηλίνης, οι ώριμες μορφές των ενδοθηλινών 1 και 2 μπορούν να δράσουν και να ενεργοποιήσουν και τα δύο είδη κυττάρων (220)

Η ενδοθηλίνη συνδέεται με δύο (2) επτα-διαμεμβρανικούς υποδοχείς συνδεδεμένους με G-πρωτεΐνη (GPCR) τους A (ET<sub>A</sub>) και B (ET<sub>B</sub>). Οι δύο (2) υπότυποι των υποδοχέων της ενδοθηλίνης διαχωρίζονται φαρμακολογικά από τη συγγενειά τους με τα τρία (3) πεπτίδια της ενδοθηλίνης. Ο υποδοχέας ET<sub>A</sub> είναι ειδικός για την ET-1 με σειρά συγγένειας ET-1>ET-2>ET-3 ενώ ο ET<sub>B</sub> εμφανίζει παρόμοια συγγένεια και για τα τρία πεπτίδια (218)(221). Και οι δύο (2) υποδοχείς κατανέμονται σε διάφορους ιστούς και όργανα αλλά τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασής τους υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός πολυλειτουργικού συστήματος ενδοθηλίνης. Όμοια υπάρχουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων στα διάφορα είδη κυττάρων της ωθήκης. Ο υποδοχέας ET<sub>A</sub> εκφράζεται κυρίως στα κύτταρα στεροειδογένεσης και τα λεία μυϊκά κύτταρα της ωθήκης (202) (222) (223) ενώ ο υποδοχέας ET<sub>B</sub> έχει πολύ υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα στεροειδογένεσης στα κύτταρα της ωθήκης του ανθρώπου (224). (Εικόνα 37)



**Εικόνα 37.** Τυπική δομή επτα-διαμεμβρανικών υποδοχέων

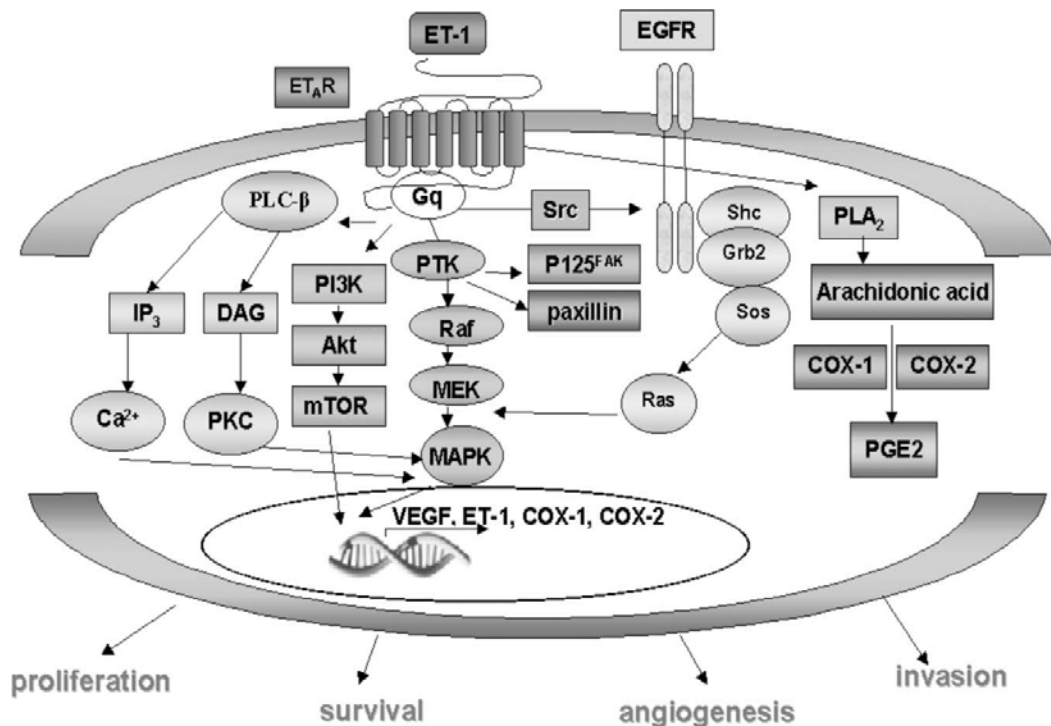
Συμπερασματικά, οι ενδοθηλίνες κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των ωθηκών και συμμετέχουν σε διάφορες αναπαραγωγικές διεργασίες. Η ET-1 καταστέλλει την πρόωρη ωχρινοποίηση των κοκκιωδών κυττάρων και προωθεί την αναστολή της ανάπτυξης του ωχρού σωματίου. Αντίθετα, η ET-2 επηρεάζει τη ρήξη του ωθυλακίου και την ανάπτυξη του ωχρού σωματίου. Οι ενδοθηλίνες διατηρούν την αγγειοσυσταλτική τους ικανότητα στις ωθήκες αλλά επιπρόσθετα κατέχουν και ρόλους που σχετίζονται με κύτταρα της στεροειδογένεσης. Διάφορα μέλη του δικτύου της ενδοθηλίνης ρυθμίζονται καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αυξάνοντας τη φυσιολογική τους λειτουργία. Η ποικιλία των μορίων που συμμετέχουν στο σύστημα της ενδοθηλίνης από σηματοδοτικά πεπτίδια, ένζυμα μετατροπής και υποδοχείς οδηγούν στη μελέτη της ενδοθηλίνης ως έναν ενδιαφέροντα κλινικό στόχο (220).

#### 4.5 Ο άξονας ενδοθηλίνης και των υποδοχέων $ETR_{A/B}$

Ανάλυση in vivo των επιπέδων έκφρασης του άξονα ενδοθηλίνης και των υποδοχέων της ανέδειξαν υψηλότερη έκφραση ET-1 και  $ET_{AR}$  σε πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους συγκριτικά με φυσιολογικούς ιστούς ωθηκών. Τα κύτταρα που παρήγαγαν ET-1 εξέφραζαν επίσης λειτουργικό  $ET_{AR}$  αλλά όχι  $ET_{BR}$  υποδεικνύοντας ότι σε καρκινικά ωθηκικά κύτταρα, η ET-1 δρα σαν αυτοκρινής παράγοντας μέσω των  $ET_{AR}$  (225). Σε ανθρώπινους όγκους, η έκφραση του

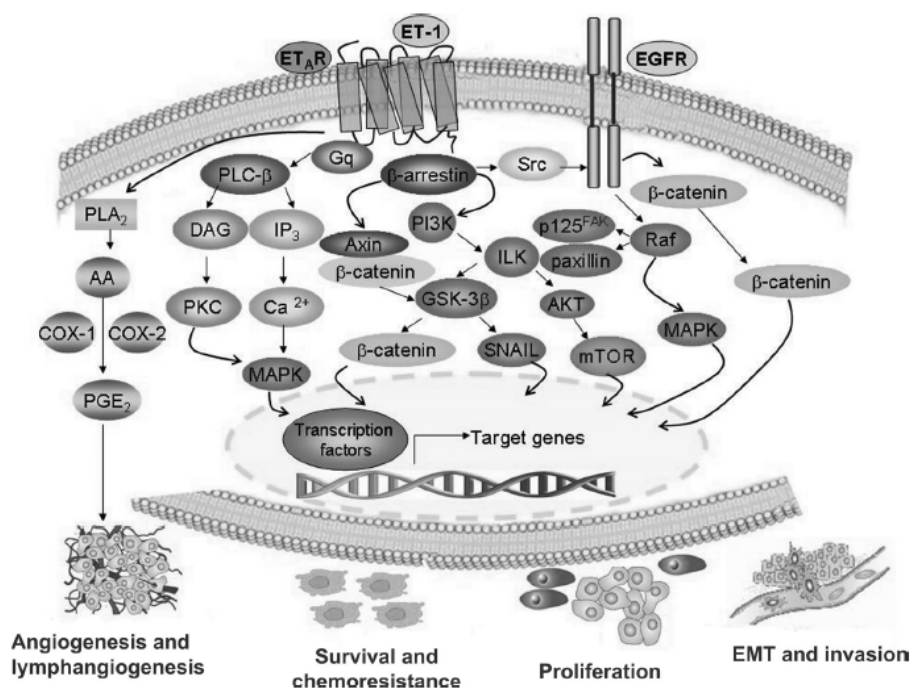
άξονα της ενδοθηλίνης σχετίζεται με σχηματισμό ασκίων, πρόοδο νόσο, υψηλότερους βαθμούς κακοήθειας και αυξημένη αγγειογένεση (226).

Τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την ET-1 μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα ET<sub>A</sub>R προκαλούν ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>), καθώς και ενεργοποίηση των PKC και MAPK. Επιπρόσθετα πρόσδεση της ET-1 στον ET<sub>A</sub>R έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης (FAK:focal adhesion kinase, paxillin) που οδηγούν στην ενεργοποίηση RAF/MEK/MAPK μονοπατιού. Στα καρκινικά κύτταρα της ωοθήκης, η ET-1 προκαλεί ενεργοποίηση του EGFR που οδηγεί μέσω σχηματισμού συμπλόκων Shc/Grb-2, στην ενεργοποίηση του μονοπατιού ras/MAPK. Η ενεργοποίηση ET<sub>A</sub>R ενεργοποιεί με τη σειρά της αντιαποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω PI3K-Akt σχετίζοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή ενδοθηλίνης με την ογκογένεση. Αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, MAPK και Akt οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων στον πυρήνα όπως VEGF, ET-1, COX-1 και -2 που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την αγγειογένεση και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Η έκφραση COX-1 και -2 και η παραγωγή προσταγλανδίνης, αυξάνουν την παραγωγή ET-1 μέσω VEGF. (227) (Εικόνα 38)



**Εικόνα 38.** Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από ενδοθηλίνη στα ωοθηκικά καρκινικά κύτταρα.(227) DG, Diacylglycerol; IP3, inositol 1,4,5 triphosphate; MAPK, mitogen activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; MEK, MAPK kinase; p125 FAK, focal adhesion kinase; PLA, phospholipase A; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Παρόλα αυτά, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον ET<sub>A</sub>R από μόνα τους δεν είναι ικανά να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα της δράσης της ενδοθηλίνης. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι ένας GPCR μπορεί να προσδεθεί σε πλήθος G-πρωτεϊνών (G-πρωτεΐνη εξαρτώμενος) όπως επίσης και σε άλλες πρωτεΐνες (G-πρωτεΐνη ανεξάρτητος) (228). Τέτοιου τύπου άλλες πρωτεΐνες είναι οι β-αρρεστίνη-1 και β-αρρεστίνη-2. Οι β-αρρεστίνες μπορούν να δράσουν σε αντίθεση ή σε συνέργεια με το σήμα της G πρωτεΐνης ενεργοποιώντας το ίδιο ένζυμο μέσω διαφορετικών μηχανισμών οδηγώντας σε διαφορετικό κυτταρικό αποτέλεσμα. Οι διάφορες λειτουργίες του GPCR μπορούν να ρυθμιστούν από την ικανότητα της β-αρρεστίνης να είναι ένας μεταγωγέας σήματος διευκολύνοντας την ενεργοποίηση στοιχείων και κατ'επέκταση στην ενεργοποίηση MAPK, στη σύνθεση του DNA, στη μετάφραση πρωτεϊνών και τη μετανάστευση κυττάρων (226). Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα ωοθήκης που εκφράζουν ET<sub>A</sub>R, έδειξαν ότι μετά τη διέγερση με ενδοθηλίνη, η β-αρρεστίνη ενσωματώνεται με τη σειρά της στον ET<sub>A</sub>R σχηματίζοντας ένα τριμερές με την Src. Το σύμπλοκο ET<sub>A</sub>R/β-αρρεστίνη/Src οδηγούν σε ενεργοποίηση EGFR και ακολούθως του μονοπατιού ras/MAPK.



**Εικόνα 39.** Ένα προτεινόμενο μοντέλο που δείχνει το πλήθος των διαφορετικών μονοπατιών που έπονται της ενεργοποίησης του ET<sub>A</sub>R από ET-1.(229)

#### 4.6 Ενδοθηλίνη και καρκίνος των ωθηκών

Ο άξονας ET-1/ET<sub>A</sub>R μέσω ενεργοποίησης διαφορετικών κινασών οδηγεί στη μεταγραφή γονιδίων όπως c-fos, c-jun και c-myc που έχουν μιτογόνο δράση (230)(231).

Στα καρκινικά κύτταρα της ωθήκης η ET-1 προάγει τη σύνθεση του DNA με την ίδια ευκολία όπως ο επιδερμικός παράγοντας αύξησης (EGF). Ωστόσο κατά ένα μέρος η κυτταρική αύξηση οφείλεται και στη συνενεργοποίηση από την ET-1 του υποδοχέα EGFR, δηλώνοντας με αυτό τον τρόπο ότι η συνύπαρξη αυτοκρινών δικτύων ET-1 και EGF παρέχουν το μέγιστο πλεονέκτημα ανάπτυξης στο κύτταρο (231)(232).

Επιπρόσθετα, στην ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού η ET-1 δρα και σαν αντι-αποπτωτικός παράγοντας σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Σε καρκινικά κύτταρα ωθηκών, η προσθήκη ET-1 ανέστειλε την απόπτωση λόγω πακλιταξέλης. Η απόπτωση λόγω της πακλιταξέλης ήταν αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του Bcl-2 η οποία καταστάληκε μετά την προσθήκη ET-1. Ανάλυση του μονοπατιού επιβίωσης του κυττάρου έδειξε ότι η ενδοθηλίνη ενεργοποίησε το μονοπάτι PI3K/Akt το οποίο και είναι αντι-αποπτωτικό. Μετά από

αυτά τα συμπεράσματα ενδεχομένως η χρήση ET<sub>A</sub>R ανταγωνιστών μπορεί να μειώσει την αύξηση του όγκου και να μην καταστέλλει την απόπτωση.

Σε ό,τι αφορά την αγγειογένεση, αυτή ελέγχεται από πολλούς ρυθμιστές όπως η τοπική υποξία που ενεργοποιεί την έκφραση αντιαγγειογενετικών παραγόντων που μπορούν να διεγείρουν την ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων. Κατά τον σχηματισμό νέων αγγείων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα διεγείρονται και απελευθερώνουν μία πρωτεάση όπως η μεταλλοπρωτεάση-2 (MMP-2), μεταναστεύουν, πολλαπλασιάζονται και διηθούν γειτονικούς ιστούς. Η ET-1 κυρίως μέσω του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R, διεγείρει αγγειογενετικές δράσεις *in vitro* και *in vivo*, και σε συνδυασμό με τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) ενισχύει τη δράση στα διάφορα στάδια της αγγειογένεσης. Στα καρκινικά κύτταρα ωθηκών η αυξημένη έκφραση ET-1 και του υποδοχέα σχετίζεται σημαντικά με την έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο τον συνεργατικό ρόλο τους κατά τη νεοαγγειογένεση του όγκου. Οι συνθήκες υποξίας διεγείρουν την έκφραση VEGF από ET-1 μέσω ενεργοποίησης HIF-1a στα καρκινικά κύτταρα των ωθηκών (233). Μετά την ενεργοποίηση ET<sub>A</sub>R από ET-1, τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1a αυξάνονται και ενδεχομένως να οδηγούν στην αύξηση της ρυθμιζόμενης από VEGF αγγειογένεσης (234).

Στα καρκινικά κύτταρα ωθήκης, η ενδοθηλίνη αυξάνει σημαντικά την έκφραση των γονιδίων COX-1 και COX-2, αυξάνει τη δραστικότητα του εκκινητή της COX-2 και την παραγωγή PGE<sub>2</sub> και VEGF. Αυτές οι δράσεις εξαρτώνται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια της MAPK που περιλαμβάνουν p42/44 MAPK, p38 MAPK και παράλληλη ενεργοποίηση του EGFR (235)(236)(237).

Η έκφραση του άξονα της ενδοθηλίνης θεωρείται ότι σχετίζεται επίσης με την λεμφαγγειογένεση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαδένων (LEC) παράγουν ET-1 και ET-3 και εκφράζουν ET<sub>B</sub>R. Σε αυτά τα κύτταρα η ET-1 προάγει τον πολλαπλασιασμό, την ενεργοποίηση MMP, τη διηθητικότητα και τη φωσφορυλίωση AKT και p42/44 MAPK μέσω ET<sub>B</sub>R (238)(239). Ωστόσο ο άξονας της ενδοθηλίνης ρυθμίζει τη λεμφαγγειογένεση μέσω και ενός έμμεσου μηχανισμού, που περιλαμβάνει την διέγερση από την ET-1 της έκφρασης του εκλεκτικού παράγοντα της λεμφαγγειογένεσης VEGF-C και του υποδοχέα του, VEGFR-3 και VEGF-A και την πυροδότηση της έκφρασης του HIF-1a όπως στην υποξία. Μπλοκάρισμα του ET<sub>B</sub>R με εκλεκτικό ανταγωνιστή αναστέλλει *in vitro* και *in vivo* τα αποτελέσματα της δράσης της ET-1, αποδεικνύοντας ότι ο υποδοχέας



ET<sub>B</sub>R σχετίζεται με τη ρύθμιση της ανάπτυξης των αγγείων και ότι αλληλεπίδραση ET-1 με τον παράγοντα HIF-1a μπορεί να μεγιστοποιήσει την εξαρτώμενη από VEGF λεμφαγγειογένεση (238)(239).

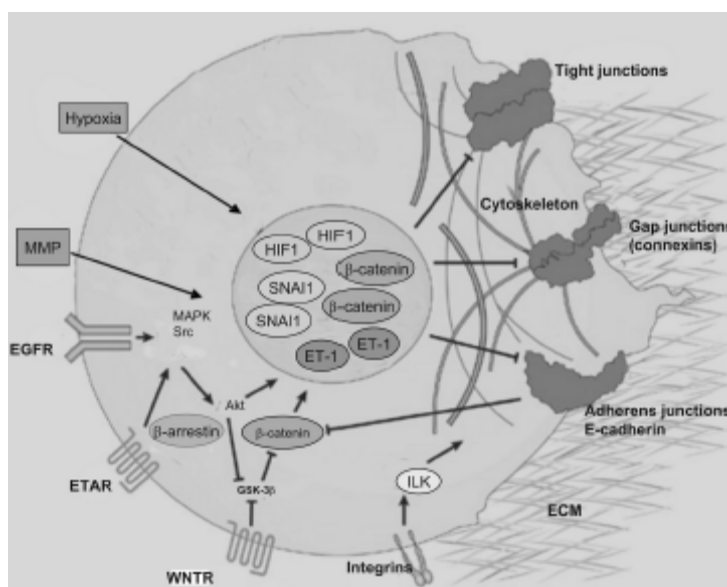
Υψηλά επίπεδα ET-1 έχουν βρεθεί στην πλειοψηφία των ασκτικών συλλογών των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών υποδηλώνοντας ότι η ET-1 μπορεί να συμμετέχει στην εξέλιξη και διηθητικότητα του καρκίνου των ωοθηκών (240). Επιπρόσθετα, σε διάφορα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, η ET-1 δρώντας μέσω ET<sub>A</sub>R πυροδότησε τη δράση δύο οικογενειών πρωτεασών, των MMPs και του συστήματος ενεργοποιητή πλασμινογόνου (uPA). Στην πραγματικότητα η ET-1 ενεργοποιεί MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-7, MMP-13. Συμπληρωματικά στις διαλυτές MMPs, η ET-1 ενισχύει την ενεργοποίηση του μεμβρανικού τύπου 1-MMP και την έκκριση από τον ιστό των αναστολέων των MMPs (TIMP-1 και -2) αυξάνοντας την ισορροπία του δικτύου MMP/TIMP που προκαλεί γρήγορη αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Συνδυασμός της διέγερσης MMPs και uPA προκάλεσε την μέγιστη διηθητικότητα στα κύτταρα του όγκου (241)(242).

Η ET-1 ενισχύει την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων της ωοθήκης στο κολλαγόνο μέσω θετικής ρύθμισης α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> και α<sub>3</sub>β<sub>1</sub>ιντεγκρινών. Αλληλεπίδραση της β<sub>1</sub>ιντεγκρίνης με το κολλαγόνο, που αντιπροσωπεύει τη μοναδική πρωτεΐνη που συνθέτει την εξωκυττάρια ουσία του μεσοθηλίου, αυξάνει τη δραστικότητα της κινάσης που συνδέεται με την ιντεγκρίνη (ILK). Η ET-1 ενδεχομένως να μιμείται αυτό το σήμα και αλληλεπιδρά με τη β<sub>1</sub>ιντεγκρίνη για να ενεργοποιήσει την ILK (243)(244). Η ενεργοποίηση της ILK φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την επαγόμενη από ET-1 μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων ωοθήκης που σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή MMP-2 και MMP-9. Τα ανωτέρω ευρήματα ταυτοποιούν την ET-1 ως ένα θετικό ρυθμιστή της ενεργοποίησης ILK μέσω των διαφορετικών επιπέδων έκφρασης της κινάσης.

Τα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθηκών στα πλαίσια της διακυτταρικής επικοινωνίας εκφράζουν διαφορετικού τύπου κονεξίνες (Cx) και κυρίως την κονεξίνη Cx43. Προβλήματα στην επικοινωνία των κυττάρων που περιλαμβάνουν μειωμένη ή ανεπαρκή έκφραση Cx43, θεωρούνται παράγοντες κλειδί για την εξέλιξη της κακοήθειας. Στα καρκινικά κύτταρα της ωοθήκης, ο άξονας ET-1/ET<sub>A</sub>R προκαλεί φωσφορυλίωση της Cx43 μέσω του μονοπατιού Cx43 και αποκόλληση των κυττάρων. Αυτή η ικανότητα της ET-1 να προκαλεί αποκόλληση των κυττάρων η οποία συμβαίνει κατά την εξέλιξη του όγκου αλλά και κατά τη διασπορά των

καρκινικών κυττάρων είναι ένα γεγονός που χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση (243).

Τέλος, βασικό ρόλο στην εξέλιξη του επιθηλιακού καρκίνου, κατέχει η μετάβαση των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (epithelial to mesenchymal transition - EMT) όπου τα καρκινικά κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων αποκτώντας ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο και την ικανότητα να μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς. Βασικό γεγονός που ρυθμίζει αυτή τη μετάβαση είναι η διακοπή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων που ρυθμίζεται από E-καντχερίνη (244). Η απώλεια έκφρασης του γονιδίου της E-καντχερίνης οφείλεται στην υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Snail, μιας πρωτεΐνης με δακτύλιο ψευδαργύρου. Αυξημένη έκφραση Snail συσχετίζεται με απώλεια έκφρασης E-καντχερίνης in vivo και in vitro. Στα καρκινικά κύτταρα ωοθήκης, η ενεργοποίηση του μονοπατιού ET<sub>A</sub>R μέσω της ET-1 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της E-καντχερίνης και β-κατενίνης και θετικά την έκφραση της μεσεγχυματικής N-καντχερίνης μέσω αύξησης του μεταγραφικού παράγοντα Snail. (Εικόνα 40)



**Εικόνα 40.** Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που πυροδοτούνται από τον ET<sub>A</sub>R και ρυθμίζουν τη μετάβαση των κυττάρων από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (229)

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### *Κεφάλαιο 5 Σκοπός της μελέτης*

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν τον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, ο τελευταίος αποτελεί την κύρια αιτία θνησιμότητας από γυναικολογικό καρκίνο παγκοσμίως. Περίπου τα δύο τρίτα (2/3) των ασθενών εμφανίζονται σε προχωρημένο στάδιο κατά τη διάγνωση (245). Δεδομένου ότι το στάδιο της νόσου αποτελεί και σε αυτό το νόσημα της ογκολογίας, ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης, στόχος της έρευνας είναι η εύρεση βιοδεικτών οι οποίοι να μπορούν να έχουν τόσο προγνωστικό όσο και ενδεχομένως προβλεπτικό ρόλο στις χορηγούμενες θεραπείες. Ένας από τους κύριους παράγοντες μεταγραφής που έχει διερευνηθεί σε διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και των κακοηθειών είναι ο NF-kB (nuclear factor kB). Ο κεντρικός ρόλος της έκφρασης NF-kB σε κανονικές συνθήκες εστιάζεται στον έλεγχο των βιοχημικών οδών που προάγουν την ανάπτυξη, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση. Ο NF-kB φαίνεται να ενεργοποιείται σε διάφορους τύπους καρκίνων. Επιπλέον, ο NF-kB μπορεί να διεγείρει τη μεταγραφή ενός μεγάλου αριθμού ρυθμιστικών γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, τη μετάσταση και άλλες βιολογικές αποκρίσεις (246). Υπάρχουν στοιχεία ότι ο NF-kB εμπλέκεται στην ογκογένεση σε πολλούς τύπους καρκίνων (247), προωθώντας την επιβίωση των κυττάρων, την αγγειογένεση και τη μεταστατικότητα της νόσου, στοιχεία που οδηγούν τελικά στην εξέλιξη της κακοήθειας αλλά και στην εμφάνιση αντοχής στην όποια χορηγούμενη θεραπεία (248).

Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί στην παθογένεση της εξέλιξης του όγκου και της νεοαγγείωσης (249). Οι επαγόμενοι από υποξία παράγοντες (Hypoxia Induced Factor) είναι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Ο επαγωγίμος από την υποξία παράγοντας 1 (HIF-1), ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από υπομονάδες HIF-1a και HIF-1b, είναι το κύριο μόριο-κλειδί που μπορεί να βοηθήσει τα υποξικά κύτταρα να αντιμετωπίσουν την υποξία, ενώ διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ογκογένεση αλλά και στη διαδικασία της απόπτωσης (250).

Η ενδοθηλίνη (ET-1) και οι υποδοχείς της έχουν επίσης εμπλακεί στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου μέσω τόσο αυτοκρινών όσο και παρακρινών οδών. Η ET-1 παράγεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και δευτερογενώς σε αγγειακά κύτταρα και δρα μέσω δύο διαφορετικών υποτύπων υποδοχέων, ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R (251). Κατά την ενεργοποίησή τους, οι υποδοχείς μεσολαβούν σε μια ποικιλία σηματοδοτικών οδών που εμπλέκονται τελικά στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της επιβίωσης, της μετανάστευσης και της μεταστατικότητας. Όσον αφορά το καρκίνωμα των ωθηκών, έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του ET-1 είναι σημαντικά αυξημένη σε καρκινώματα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ωθηκικούς ιστούς (229). Η ET-1 δρα επιλεκτικά κυρίως μέσω του υποδοχέα ενδοθηλίνης A (ET<sub>A</sub>R) και εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην διεισδυτικότητα, στη νεοαγγείωση και στην πρόληψη της απόπτωσης, προάγοντας έτσι την καρκινογένεση (252).

Επιπλέον, το CD10 (επίσης γνωστό ως αντιγόνο οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας CALLA ή Neutral endopeptidase-ουδέτερη ενδοπεπτιδάση), ένα αντιγόνο επιφανείας του T-κυττάρου, έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στην πρόοδο της ογκογένεσης σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκινώματος των ωθηκών. Συγκεκριμένα, η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP) είναι μια πεπτιδάση κυτταρικής επιφάνειας με μια πανταχού παρούσα έκφραση που εμπλέκεται στην καταλυτική αποικοδόμηση ενός αριθμού βιοδραστικών πεπτιδίων περιλαμβανομένης της ET-1 (253).

Η NEP εμπλέκεται στο νεοπλασματικό μετασχηματισμό και στην εξέλιξη του όγκου σε ορισμένες ανθρώπινες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων καρκίνων πνεύμονος, μαστού, προστάτη και ωθηκών, απενεργοποιώντας την ET-1 η οποία θεωρείται αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας για αυτούς τους όγκους. Ως αποτέλεσμα, η απώλεια ή η μείωση της έκφρασης NEP επιτρέπει την παρουσία των πεπτιδικών υποστρωμάτων (συμπεριλαμβανομένου της ET-1) επί της κυτταρικής επιφάνειας που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω των συγγενών υποδοχέων της και έτσι τη διευκόλυνση της εξέλιξης της νεοπλασίας (254).

Μέχρι σήμερα, μόνο λίγα δεδομένα υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τον αντίκτυπο της έκφρασης NF-κB, HIF-1a, CD10 και ETR στην πρόγνωση του καρκίνου των ωθηκών, ενώ τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από *in vitro* μελέτες σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να αναδείξουμε *in vivo* χρησιμοποιώντας ιστό ενσωματωμένο σε παραφίνη και ανοσοϊστοχημική προσέγγιση, στο πλαίσιο μιας μεταφραστικής έρευνας, στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής, σε συνδυασμό με κλινικά στοιχεία που προέκυψαν από αναδρομική καταγραφή κλινικών πληροφοριών, εάν η έκφραση αυτών των δεικτών έχει κάποια προγνωστική ή ακόμα και προβλεπτική αξία σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα.

## *Κεφάλαιο 6 Ασθενείς και μέθοδοι*

### *6.1 Χαρακτηριστικά μελέτης*

Πρόκειται για αναδρομική μελέτη παρατήρησης που αφορά σε ένα κέντρο. Συγκεκριμένα, συνολικά 94 ασθενείς με διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών, οι οποίες αντιμετωπίστηκαν χειρουργικά στη Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας και εν συνεχεία παραπέμφθηκαν στην Ογκολογική κλινική, συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Η παθολογοανατομική εκτίμηση του βιοπτικού υλικού των ασθενών έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όλες οι ασθενείς ήταν άνω των 18 ετών.

### *6.2 Ασθενείς*

Οι ασθενείς που παρακολουθούνταν τελικά στην Ογκολογική κλινική και συμπεριλήφθησαν στη μελέτη είχαν διαγνωσθεί στη Γυναικολογική κλινική από το 2001 έως και το 2010 ενώ τα δεδομένα τελευταίας επιβίωσης των ασθενών καταγράφηκαν έως και 11/2015 (ημερομηνία τελευταίας παρακολούθησης). Τα δεδομένα που καταγράφηκαν αφορούσαν δημογραφικά στοιχεία, στοιχεία από το γυναικολογικό ιστορικό (ηλικία εμμηναρχής, τελευταία έμμηνος ρύση) ημερομηνία διάγνωσης, αρχική σταδιοποίηση καθώς και ευρήματα απεικονιστικού ελέγχου στις επόμενες γραμμές θεραπειών, στοιχεία της ιστοπαθολογικής εξέτασης από το χειρουργείο (είδος χειρουργείου, πλήρης εξαίρεση της νόσου ή όχι, ιστολογικός τύπος, βαθμός αποδιαφοροποίησης, ύπαρξη διηθημένων λεμφαδένων, ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης), χορήγηση εισαγωγικής ή επικουρικής χημειοθεραπείας, καθώς και δεδομένα από τις υποτροπές και τις υπόλοιπες γραμμές θεραπείας. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα υπολογίστηκε η συνολική επιβίωση (οριζόμενη ως

ο χρόνος από την αρχική διάγνωση έως την ημερομηνία θανάτου αν αυτή ήταν καταγεγραμμένη ή ως την τελευταία ημερομηνία για την οποία έχουμε δεδομένα-τελευταία επίσκεψη), το διάστημα ελεύθερο νόσου (disease free survival - DFS) εφόσον πρόκειται για επικουρική θεραπεία μετά από πλήρη μακροσκοπικά εξαίρεση της νόσου (optimal debulking), το διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου (progression free survival - PFS) εφόσον η θεραπεία ήταν 1<sup>ης</sup> γραμμής μετά από μη βέλτιστο ογκομειωτικό χειρουργείο. Επίσης καταγράφησαν δεδομένα που αφορούσαν την πλατινοευαισθησία της νόσου (χρόνος από την τελευταία λήψη θεραπείας με βάση την πλατίνα μέχρι την 1<sup>η</sup> υποτροπή όπως θα ορισθεί αναλυτικότερα στη συνέχεια).

Σε ό,τι αφορά επομένως τα βασικά χαρακτηριστικά της ομάδας αυτής των ασθενών, η μέση ηλικία κατά τη στιγμή της εγχείρησης ή της διάγνωσης, στην περίπτωση όπου η νόσος ήταν μεταστατική ή τοπικά προχωρημένη οπότε και δεν πραγματοποιήθηκε χειρουργική εξαίρεση της νόσου, ήταν  $52,3 \pm 12,1$  έτη.

Οι ιστολογικοί τύποι όπως αυτοί προέκυψαν είτε από βιοψία, είτε μετά τη χειρουργική εξαίρεση της νόσου ήταν οι ακόλουθοι: ορώδες (n=54, 57,4%), βλεννώδες (n=9, 9,6%), ενδομητριοειδές (n=9, 9,6%), διαυγοκυτταρικό (n=2, 2,1%), μεικτής ιστολογίας (n=15, 16%) και άλλοι ασυνήθεις τύπους (n=5, 5,3%).

Σε ό,τι αφορά τη σταδιοποίηση όπως αυτή προέκυψε μετά τη διενέργεια χειρουργικών επεμβάσεων (σε περίπτωση όπου αυτή πραγματοποιήθηκε), 23 ασθενείς διεγνώσθησαν με νόσο σταδίου I (24,5%), 7 ασθενείς από αυτές οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη είχαν νόσο σταδίου II (7,4%), 59 ασθενείς διεγνώσθησαν με τοπικά προχωρημένη νόσο σταδίου III (62,8%) ενώ σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών 5 στις 94 συνολικά ασθενείς (5,3%) η νόσος ήταν ήδη σταδίου IV με απομακρυσμένες μεταστατικές εστίες. Η σταδιοποίηση καθώς και ο προσδιορισμός της επιθετικότητας της νόσου (grade) καθορίστηκαν σύμφωνα με τα πρότυπα της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γυναικολογίας και Μαιευτικής. Στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης (6ετής συνολικά παρακολούθηση), 41 από τις συνολικά 94 ασθενείς (43,6%) είχαν αποβιώσει λόγω της ασθένειάς τους.

Όσες από τις ασθενείς, οι οποίες συμπεριλαμβάνονταν στη μελέτη, και υποβλήθηκαν αρχικά σε ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων (total abdominal hysterectomy and bilateral salpingoophorectomy), βάσει της σταδιοποίησής τους, έλαβαν μετεγχειρητικά έξι (6) κύκλους πακλιταξέλης σε δόση  $175 \text{ mg/m}^2$  και

καρβοπλατίνα σε δόση που υπολογιζόταν βάσει της περιοχής κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης (AUC 6) κάθε τρεις (3) εβδομάδες.

Μεταξύ των 94 ασθενών, 17/94 (18,1%) ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα (ανέπτυξαν πλατινοάντοχη νόσο όπου ορίζεται ως αντοχή ή πρόοδος νόσου υπό χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα ή πρόοδος νόσου σε διάστημα λιγότερο από την πάροδο έξι (6) μηνών από την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας). Αντίστοιχα, 77/94 (81,9%) ασθενείς είχαν πλατινοευαίσθητη νόσο (νόσο που ανταποκρίθηκε πλήρως ή μερικώς, όπως θα ορίσουμε παρακάτω, σε χημειοθεραπεία που συμπεριελάμβανε πλατινούχο σκεύασμα, ενώ στην περίπτωση της υποτροπής αυτή εμφανιζόταν μετά την πάροδο 6 μήνου από το τελευταίο χημειοθεραπευτικό σχήμα).

Η παραπάνω διάκριση σε πλατινοευαίσθητη ή πλατινοάντοχη νόσο (διχότομη μεταβλητή) με όριο τους έξι (6) μήνες, χρησιμοποιήθηκε για ευκολότερη στατιστική ανάλυση του περιορισμένου σχετικά δείγματος, καθώς στη βιβλιογραφία η νόσος του επιθηλιακού καρκίνου των ωθηκών, μπορεί να χαρακτηριστεί ως πλατινοάντοχη-platinum refractory στην περίπτωση όπου η πρόοδος νόσου διαπιστώνεται υπό χημειοθεραπεία με πλατίνα, πλατινοανθεκτική-platinum resistant αν η πρόοδος νόσου συμβεί σε διάστημα λιγότερο από έξι (6) μήνες από την ολοκλήρωση της θεραπείας, μερικώς πλατινοευαίσθητη-partial platinum sensitive με πρόοδο νόσου σε διάστημα μεταξύ 6-12 μήνες και πλατινοευαίσθητη νόσος-platinum sensitive με πρόοδο νόσου μετά από την πάροδο έτους από την ολοκλήρωση της πλατίνας.

Η ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία αξιολογήθηκε ως εξής: Καμία απόδειξη της νόσου δεν είχε οριστεί ως η πλήρης απόκριση της νόσου για τουλάχιστον τέσσερις (4) εβδομάδες (με φυσική εξέταση, υπερηχογράφημα ή υπολογισμένη τομογραφία σάρωσης), ενώ η προοδευτική ασθένεια χαρακτηρίστηκε ως αύξηση κατά τουλάχιστον 25% του μεγέθους της μετρήσιμης αλλοίωσης ή εμφάνιση μιας ξεκάθαρης νέας βλάβης που ξεκίνησε τη χημειοθεραπεία. Κλινικά και δημογραφικά στοιχεία των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

		n=94	%
Stage	I	23	24.5
	II	7	7.4
	III	59	62.8
	IV	5	5.3
Type			
	Serous	54	57.4
	Mucinous	9	9.6
	Endometrioid	9	9.6
	Clear cell carcinoma	2	2.1
	Mixed cell type	15	16
	Uncommon types	5	5.3
Sensitive to platinum		77	81.9
Resistance to platinum		17	18.1
Status			
	Dead	41	43.6
	Alive	53	56.4

**Πίνακας 9.** Κλινικά και δημογραφικά στοιχεία των ασθενών



### 6.3 Μέθοδοι

Δείγματα ιστών από ασθενείς που νόσησαν από επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, τα οποία είχαν αρχικά σταθεροποιηθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλίνης 10%, και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε συστηματική επεξεργασία και ενσωμάτωση σε παραφίνη προκειμένου να αποθηκευθούν, χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη μας. Οι τομές κόπηκαν στα 3μm με τη χρήση μικροσκοπίου Leica micro Tome TP1020 και ξηράνθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 60 °C.

Για την παρασκευή τμημάτων για ανοσοϊστοχημεία, μετά από ένα πρώτο στάδιο αποπαραφινισμού χρησιμοποιώντας ξυλόλιο, τα τμήματα επανυδατώθηκαν σε μειούμενα διαλύματα αιθανόλης. Μετά από αυτό, χρησιμοποιήθηκε μια αραίωση υπεροξειδάσης υδρογόνου 0,3% για 10 λεπτά για να εμποδίσει την ενδογενή δραστικότητα υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια, επιτεύχθηκε βέλτιστη ανάκτηση αντιγόνου με τομές microwaving σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού διαλύματος 0,01 M (pH 6) επί 20 λεπτά. Τέλος, τα τμήματα ψύχθηκαν και πλύθηκαν σε Tris Buffer Saline (TBST) τρεις (3) φορές.

Οι τομές ιστού επώαστηκαν με κάθε αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου. Διεξήχθη διαδικασία ανοσοχρώσης με τα αντισώματα που απαριθμούνται στον Πίνακα 2. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε όλους τους ασθενείς (n=94) για την ανίχνευση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των NFκB, HIF-1a και CD-10, ενώ η ανίχνευση ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R πραγματοποιήθηκε σε 70 μόνο δείγματα. Η περίοδος επώασης ήταν 30 λεπτά για NFκB, HIF-1a και CD-10 και 60 λεπτά για ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R. Μετά την ανοσοχρωματοποίηση, οι πλάκες πλύθηκαν σε TBST και προστέθηκε ένα ευαίσθητο υγρό ανίχνευσης (ένα νέο σύστημα πολυμερικής τεχνολογίας μη βιοτίνης που περιέχει 2 κύρια συστατικά: Super Enhancer και ένα αντιδραστήριο Poly-HRP για την εξάλειψη των προβλημάτων που σχετίζονται με την ενδογενή βιοτίνη) (Biogenex), ακολουθούμενη από επώαση για 50 λεπτά. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν, απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας 0,05% διάλυμα 3,3'-διαμινοβενζιδίνης (διάλυμα DAB, DAKO). Τέλος, το ένζυμο υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (HRP) καταλύει τη μετατροπή των χρωμογόνων υποστρωμάτων (π.χ. DAB, AEC) σε χρωματιστά προϊόντα που διευκολύνουν με αυτό τον τρόπο τη χρώση ιστών. Σε τελικό στάδιο, οι τομές αντισταμίστηκαν με αιματοξυλίνη.

Antibody	Optimal dilution	Company
NFkBp65, clone F-6	1:500 for 30min	SantaCruz
HIF-1a, clone H1alpha	1:25 for 30min	Novus
CD10, clone 56C6	1:30 for 30min	Dako
ET <sub>A</sub> R, clone N-15	1:100 for 60min	Santa Cruz
ET <sub>B</sub> R, clone A-20	1:100 for 60min	Santa Cruz

**Πίνακας 10.** Αντισώματα

Όλα τα πλακίδια εξετάστηκαν τυφλά και ανεξάρτητα από δύο (2) παθολογοανατόμους. Οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν για όλους τους περαιτέρω υπολογισμούς. Εάν παρατηρήθηκαν διαφορές μεγαλύτερες του 30% μεταξύ των παρατηρητών, αυτά τα πλακίδια επανεξετάστηκαν και από τους δύο (2) ερευνητές και επιτεύχθηκε τελική βαθμολογία συναίνεσης για περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

Ο προσδιορισμός των NFkB / p65 και HIF-1a πραγματοποιήθηκε τόσο στο κυτταροπλασματικό όσο και στο πυρηνικό διαμέρισμα. Η ανίχνευση ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R ήταν μεμβρανώδης ενώ η ανοσοχρώση με CD10 έδωσε ένα διάχυτο κυτταροπλασματικό ή μεμβρανικό πρότυπο χρώσης.

Η ένταση της ανοσοαντιδραστικότητας για κάθε δείκτη ανοσοχρώσης βαθμολογήθηκε ως εξής: 0 - καμία (καμία ανιχνεύσιμη ανοσοχρώση σε κύτταρα όγκου), 1 - ασθενής (ασθενής χρώση στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων), 2 - μέτρια (ένταση μεσαίας χρώσης κυττάρων όγκου) και 3 - ισχυρή (υψηλή ένταση χρώσης του όγκου). Ο επιπολασμός των νεοπλασματικών κυττάρων με κυτταροπλασματική χρώση καθορίστηκε περίπου σε ολόκληρη την περιοχή του όγκου, ενώ το ποσοστό πυρηνικής χρώσης προσδιορίστηκε μετρώντας θετικούς

καρκινικούς πυρήνες σε 500 κύτταρα όγκου. Η συνολική ανοσοϊστοχημική βαθμολογία (histoscore) εκφράστηκε ως το ποσοστό θετικών κυττάρων όγκου (100%) πολλαπλασιασμένο με την ένταση χρώσης (0 = αρνητικό, 1 = ασθενές, 2 = μέτριο, 3 = ισχυρό). Συνεπώς, το συνολικό score για κάθε δείκτη (histoscore) κυμαίνεται από 0 έως 300.

## *Κεφάλαιο 7 Στατιστική ανάλυση*

Σε ό,τι αφορά τα περιγραφικά στατιστικά στοιχεία των μεταβλητών, η μέση (mean) και η σταθερή απόκλιση (standard deviation) χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτικές συνεχείς μεταβλητές παραμετρικές (με κανονική κατανομή), ενώ η διάμεση τιμή (median) και το διατεταρτημοριακό διάστημα (interquartile range) για μη παραμετρικές συνεχείς μεταβλητές. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με δοκιμασία t-test,  $\chi^2$  (two by two with Yates' correction) και δοκιμασία Fisher (Fischer's exact test) αναλόγως των μελετούμενων μεταβλητών (διχότομη - ποιοτική έναντι συνεχούς - ποσοτικής μεταβλητής με κανονική κατανομή ή μη). Κάθε τιμή p κάτω από 0,050 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Ως συνολική επιβίωση (OS) ορίζεται το διάστημα από την ημερομηνία της διάγνωσης (βιοψία ή κυτταρολογική) ή από την ημερομηνία χειρουργικής επέμβασης, μέχρι την τελευταία καταγραφή δεδομένων από το κέντρο παρακολούθησής τους, δεδομένου ότι οι ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο των ωοθηκών ήταν ακόμα ζωντανοί, ενώ η επιβίωση χωρίς ασθένεια (DFS) ορίζεται ως η περίοδος χωρίς ενδείξεις επανεμφάνισης της νόσου (είτε με συμπτώματα είτε με νέα απεικονιστικά ευρήματα π.χ αξονικών τομογραφιών, μόνο βιοχημική υποτροπή με αύξηση του CA125 δε θεωρήθηκε από μόνη της ένδειξη υποτροπής της νόσου ικανή να οδηγήσει σε νέα ή απλώς αλλαγή γραμμής χημειοθεραπείας). Οι παραπάνω δύο παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν για να ελέγξουν την πιθανότητα επιβίωσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kaplan-Meier (καμπύλες επιβίωσης). Όλες οι παράμετροι που θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές στη μονοπαραγοντική ανάλυση Kaplan-Meier ( $p < 0,050$ ) ή θεωρούνται σημαντικές βάσει κλινικών δεδομένων, ανεξαρτήτως στατιστικής σημαντικότητας (δεδομένου ότι αναφερόμαστε σε μικρή αναδρομική ανάλυση πραγματικών δεδομένων) χρησιμοποιήθηκαν σε πολυπαραγοντικό μοντέλο (Cox Regression) προκειμένου να εντοπισθούν πιθανοί ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου. Η

στατιστική ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας SPSS έκδοση 17.0 (IBM, Armonk, NewYork, USA).

## Κεφάλαιο 8 Ηθική και δεοντολογία

Η μελέτη είναι μονοκεντρική, αναδρομική μελέτη μη παρεμβατικής κοόρτης, η οποία ως εκ των ανωτέρω περιλαμβάνει απλή καταγραφή κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών, ενώ συνδυάζεται με αναδρομική μεταφραστική έρευνα και επεξεργασία αρχειακού παθολογοανατομικού υλικού, χωρίς να επηρεάζεται ωστόσο όποια διαγνωστική ή θεραπευτική προσέγγιση, και άρα να επηρεάζεται η τελική έκβαση της υγείας των ασθενών ή να παραβιάζονται τα νόμιμα δικαιώματά τους.

Τα δεδομένα των ασθενών καταγράφονται ανώνυμα, ενώ η όποια δημοσίευση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με την μορφή συγκεντρωτικών πινάκων, κάτι που δεν αντιτίθεται στις προσωπικές ή θρησκευτικές πεποιθήσεις των ασθενών.

Δεδομένου ότι αφορά σε ασθενείς με κακοήθεια, ένα ποσοστό δεν ήταν εν ζωή κατά την πραγματοποίηση της εργασίας και ως εκ των ανωτέρω δεν ήταν δυνατή η έγγραφη συγκατάθεση των συμμετεχόντων. Για το λόγο αυτό η μελέτη διεξήχθη μετά από έγκριση από το συμβούλιο δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο πλαίσιο εκπόνησης διδακτορικής διατριβής.

## Κεφάλαιο 9 Αποτελέσματα

### 9.1 Περιγραφική στατιστική

Σε ό,τι αφορά τη μέση τιμή (mean± SD) του histoscore στους διαφορετικούς δείκτες που μελετήθηκαν ανοσοϊστοχημικά προέκυψαν τα παρακάτω σε ό,τι αφορά τον κυτταροπλασματικό και τον πυρηνικό δείκτη: NFκB cytoscore: 219.4 ± 63.9, NFκB nucleoscore: 32.7 ± 46, HIF-1a cytoscore: 119.6 ± 81.5, HIF-1a nucleoscore: 108.9 ± 84.3, CD-10 score: 30.8 ± 58.2, ET<sub>A</sub>Rscore: 84.1 ± 112.1, ET<sub>B</sub>Rscore: 48.1 ± 70.3 .

Histoscore	Sample (n=94)	%
<u>NFκB cytoscore</u>		
Mean ± SD	219.4 ±63.9	

SCORE <100/>100	7/87	7.4/92.6
SCORE <150/>150	9/85	9.4/10.6
SCORE <200/>200	39/55	41.5/58.5
<u><i>NFkB nuclearscore</i></u>		
Mean ± SD	32.7 ± 46	
SCORE <25/>25	32/62	34/66
SCORE <50/>50	86/8	91.5/8.5
SCORE <100/>100	87/7	92.6/7.4
<u><i>HIF-1A cytoscore</i></u>		
Mean ± SD	119.6 ± 81.5	
SCORE <75/>75	35/59	37.2/62.8
SCORE <100/>100	44/50	46.8/53.2
SCORE <150/>150	61/33	64.9/35.1
<u><i>HIF-1A nuclearscore</i></u>		
Mean ± SD	108.9 ± 84.3	
SCORE <75/>75	31/63	33/67
SCORE <100/>100	46/48	47.9/52.1
SCORE <150/>150	66/28	70.2/29/8
<u><i>CD-10 score</i></u>		
Mean ± SD	30.8 ± 58.2	
SCORE <25/>25	69/25	73.4/26/6
SCORE <50/>50	75/19	79.8/20.2

SCORE <75/>75	79/15	84/16
<u>ET<sub>A</sub>Rscore</u>		
Mean ± SD	84.1 ± 112.1	
SCORE <75/>75	44/26	62.9/37.1
SCORE <100/>100	47/23	67.1/32.9
SCORE <150/>150	48/22	68.6/31.4
SCORE <200/>200	59/11	84.3/15.7
<u>ET<sub>B</sub>Rscore</u>		
Mean ± SD	48.1 ± 70.3	
SCORE <75/>75	47/23	67.1/32.9
SCORE <100/>100	53/17	75.7/24.3
SCORE <150/>150	62/8	88.6/11.4
SCORE <200/>200	69/1	98.6/1.4

**Πίνακας 11.** Histoscore με διαφορετικά cutoff

### 9.2 Histoscore και συσχετίσεις

Τα τελικά αποτελέσματα για ανάλυση διεξήχθησαν μετά την διχοτόμηση των ασθενών σε δύο (2) μέρη με βάση τον ιστοικό (histoscore) κάθε δείκτη (σύμφωνα με την διάμεση τιμή κάθε δείκτη). Τα συνολικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

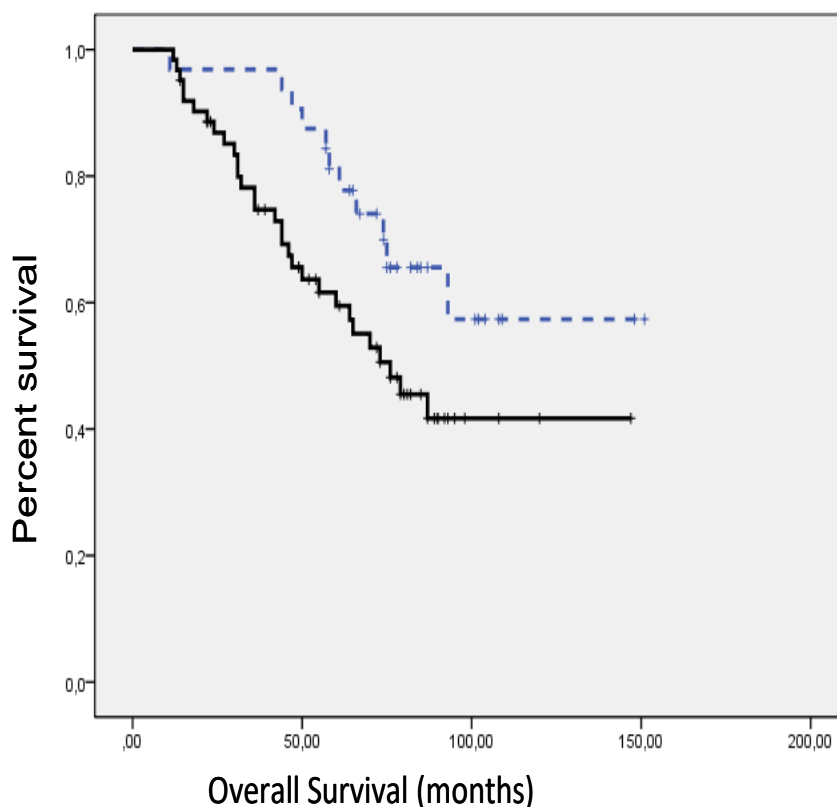
<b>Histoscore</b>	<b>Sample (n=94)</b>	<b>%</b>
<u>NFκB cytoscore</u> Mean ± SD	219.4 ±63.9	

SCORE <200/>200	39/55	41.5/58.5
<u>NFkB nucleoscore</u> Mean $\pm$ SD	32.7 $\pm$ 46	
SCORE <25/>25	32/62	34/66
<u>HIF-1cytoscore</u> Mean $\pm$ SD	119.6 $\pm$ 81.5	
SCORE <75/>75	35/59	37.2/62.8
<u>HIF-1nucleoscore</u> Mean $\pm$ SD	108.9 $\pm$ 84.3	
SCORE <75/>75	31/63	33/67
<u>CD-10 score</u> Mean $\pm$ SD	30.8 $\pm$ 58.2	
SCORE <25/>25	69/25	73.4/26/6
<u>ET<sub>A</sub>Rscore</u> Mean $\pm$ SD	84.1 $\pm$ 112.1	
SCORE <75/>75	44/26	62.9/37.1
<u>ET<sub>B</sub>Rscore</u> Mean $\pm$ SD	48.1 $\pm$ 70.3	
SCORE <75/>75	47/23	67.1/32.9

**Πίνακας 12.** Histoscore τελικά βάσει μέσω τιμών

### 9.3 Συσχέτιση συνολικής επιβίωσης (OS) με histoscore του κάθε βιοδείκτη

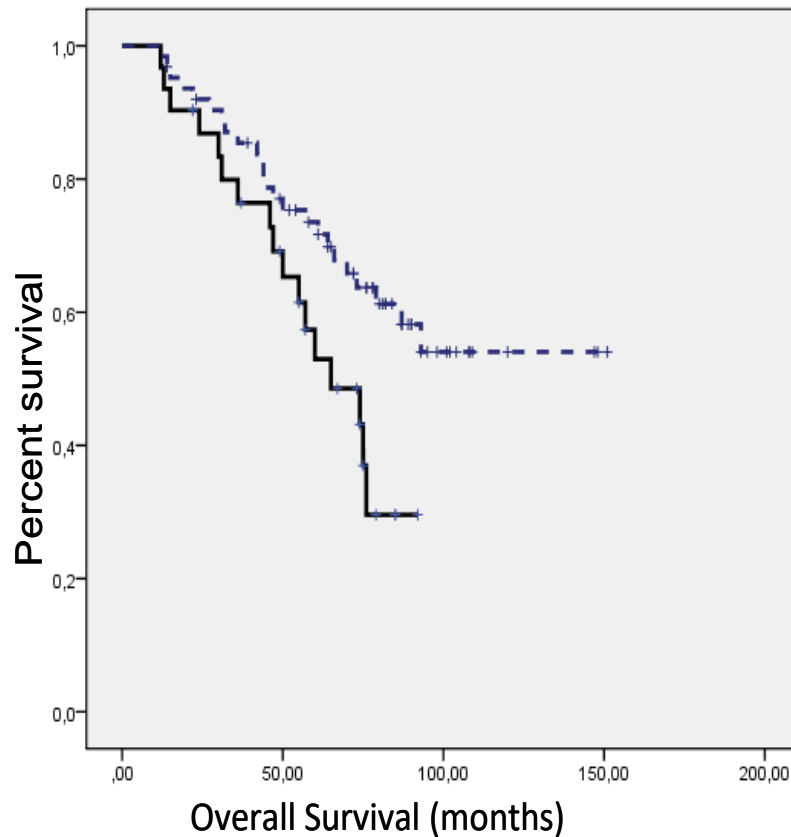
Παρά τη χρήση διαφορετικών σημείων cutoff histoscore για θετικότητα, το κυτταροπλασματικό histoscore του NFkB δεν συσχετίστηκε με οποιοδήποτε κέρδος λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική επιβίωση (OS) των ασθενών. Αντίθετα, η πυρηνική έκφραση του NFkB συσχετιζόταν αντιστρόφως ανάλογα με τη συνολική επιβίωση (χαμηλό πυρηνικό NF-kB συσχετίστηκε με αυξημένο OS) ανεξάρτητα από το στάδιο. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με πυρηνική χρώση NFkB>25 είχαν OS  $113,5 \pm 9,1$  μήνες σε σύγκριση με  $88,1 \pm 7,4$  μήνες ασθενών με πυρηνικό NF-kB> 25, ( $p = 0,048$ ). (Εικόνα 41)



**Εικόνα 41.** Η υψηλή πυρηνική έκφραση του NFKB συσχετίζεται με έναν κλινικά επιθετικό φαινότυπο όγκου. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier δείχνουν ότι οι ασθενείς με υψηλό histoscore (μαύρη συνεχής γραμμή) είχαν μειωμένη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με τους ασθενείς με χαμηλή πυρηνική έκφραση NFKB (μπλε διακεκομμένη γραμμή) ( $88,1 \pm 7,4$  έναντι  $113,5 \pm 9,1$  μήνες,  $p = 0,048$ )

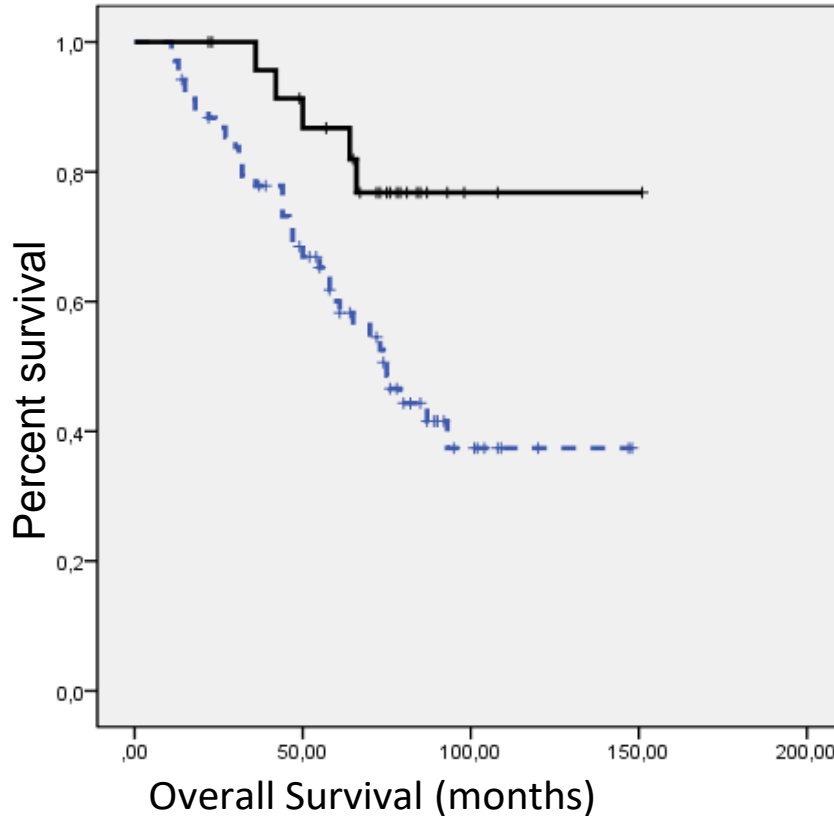
Η κυτταροπλασματική έκφραση του HIF-1a επίσης δεν συσχετίστηκε με OS των ασθενών σε οποιαδήποτε σύγκριση (χρησιμοποιώντας διαφορετικά cutoffs histoscore για θετικότητα), ενώ η πυρηνική έκφραση συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τη συνολική επιβίωση OS (χαμηλή πυρηνική χρώση HIF-1a συσχετίστηκε με υψηλή συνολική επιβίωση). Συγκεκριμένα, ασθενείς με πυρηνικό HIF-1a μικρότερο από 75 είχαν συνολική επιβίωση OS  $105,6 \pm 7,2$  μήνες σε σύγκριση με  $62,2 \pm 5$  μήνες ασθενών με πυρηνικό score > 75 ( $p = 0,029$ ). (Εικόνα 42)





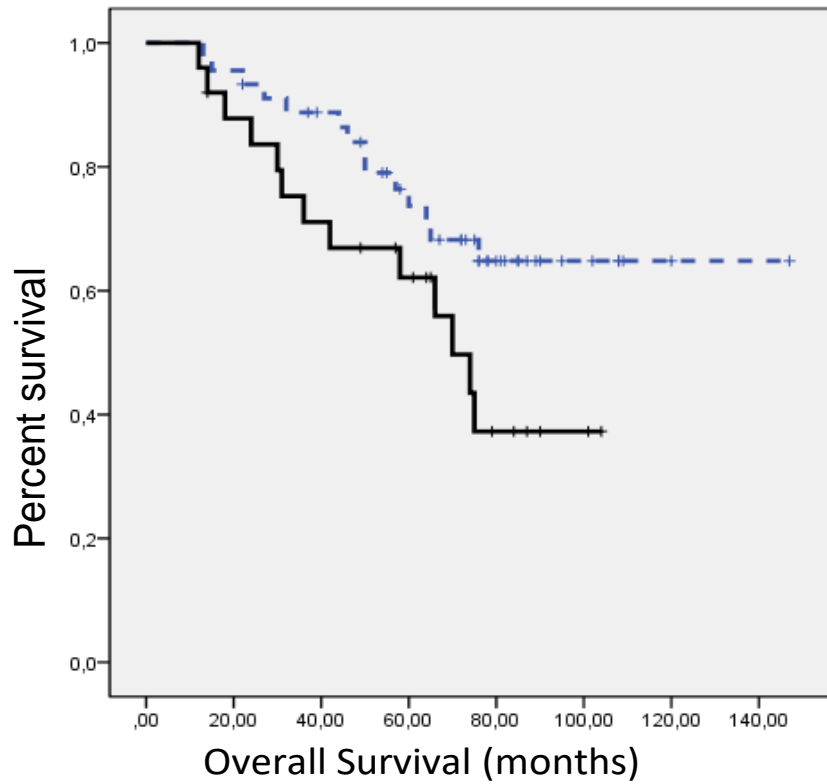
**Εικόνα 42.** Η υψηλή πυρηνική έκφραση HIF-1a συσχετίζεται με έναν κλινικά επιθετικό φαινότυπο όγκου. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier δείχνουν ότι οι ασθενείς με υψηλό histoscore (μαύρη συνεχής γραμμή) είχαν χειρότερη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλό πυρηνικό HIF-1a (μπλε διακεκομμένη γραμμή) ( $62,2 \pm 5$  έναντι  $105,6 \pm 7,2$  μήνες,  $p = 0.029$ )

Η έκφραση του CD-10 συσχετίζεται έντονα με τη συνολική επιβίωση OS (τιμή cutoff: 25 histoscore). Συγκεκριμένα, ασθενείς με χαμηλή έκφραση CD-10 (histoscore < 25) είχαν χειρότερη επιβίωση OS  $86,8 \pm 6,8$  σε σύγκριση με  $128,1 \pm 9$  μήνες ασθενών με υψηλή έκφραση CD-10 (histoscore > 25) ( $p = 0,011$ ) ανεξαρτήτως του σταδίου της νόσου. (Εικόνα 43)

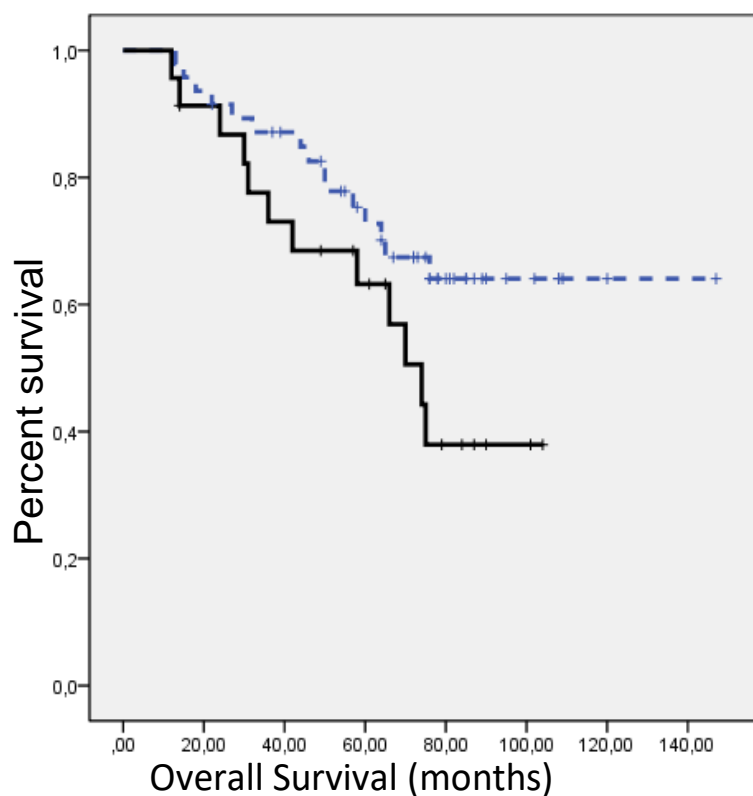


**Εικόνα 43.** Η χαμηλή έκφραση CD-10 συσχετίζεται με κλινικά επιθετικό φαινότυπο όγκου. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier δείχνουν ότι οι ασθενείς με υψηλό histoscore (μαύρη συνεχής γραμμή) είχαν καλύτερη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλό histoscore (μπλε διακεκομμένη γραμμή) (cutoff: 25)

Τέλος, η έκφραση του υποδοχέα A της ενδοθηλίνης ET<sub>A</sub>R, συσχετίζεται έντονα με τη συνολική επιβίωση. Οι ασθενείς με χαμηλό histoscore ET<sub>A</sub>R είχαν καλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλό histoscore ET<sub>A</sub>R (τιμή cutoff: 75 histoscore) 113,5 ± 7,7 έναντι 66,4 ± 6,9 μήνες p=0,026 (Εικόνα 4). Αντίθετα, η έκφραση του υποδοχέα B της ενδοθηλίνης ET<sub>B</sub>R, δεν συσχετίστηκε με τη συνολική επιβίωση OS των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Ωστόσο, υπήρξε μια τάση για καλύτερο OS για τους ασθενείς με histoscore ET<sub>B</sub>R < 75 έναντι ασθενών με histoscore > 75 (110,3 ± 7,7 έναντι 69 ± 7,1 μηνών, p = 0,076). (Εικόνα 44)



**Εικόνα 44.** Η υψηλή έκφραση ET<sub>A</sub>R συσχετίζεται με έναν κλινικά επιθετικό φαινότυπο όγκου. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier δείχνουν ότι οι ασθενείς με χαμηλό histoscore (μπλε διακεκομμένη γραμμή) είχαν καλύτερη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλό histoscore (μαύρη συνεχής γραμμή) (τιμή cutoff: 75)



**Εικόνα 45.** Έκφραση ET<sub>B</sub>R και OS. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier δείχνουν ότι οι ασθενείς με υψηλό histoscore (μαύρη συνεχής γραμμή) είχαν τάση να συσχετίζονται στατιστικά με μειωμένη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με τους ασθενείς με χαμηλή βαθμολογία (μπλε διακεκομμένη γραμμή) (110,3 ± 7,7 vs 69 ± 7,1 μήνες, p= 0,076)

#### 9.4 Έκφραση βιοδεικτών και συσχέτισή τους με ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα

Στο πλαίσιο της έρευνας μας φάνηκε πως τα histoscore των υπό μελέτη βιοδεικτών συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με τις απαντήσεις στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία.

Έτσι, οι ευαίσθητοι στην πλατίνα ασθενείς είχαν χαμηλότερο πυρηνικό NFκB, υψηλότερο κυτταροπλασματικό HIF-1α, υψηλότερο CD-10 και χαμηλότερη έκφραση ET<sub>A</sub>R (Πίνακας 13). Ωστόσο δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των histoscore του κυτταροπλασματικού NFκB, του πυρηνικού HIF-1α και του ET<sub>B</sub>R και της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία.

Histoscore	Chemotherapy response		p value
	resistance	sensitive	
<u>NFkB nuclear score</u> <25	2	30	0.046
>25	15	47	
HIF-1A cytoscore<75	10	25	0.042
>75	7	52	
HIF-1A cytoscore<100	11	33	0.086
>100	6	44	
<u>CD-10 score</u> <25	17	52	0.004
>25	0	25	
<u>CD-10 score</u> <50	17	58	0.019
>50	0	19	
<u>CD-10 score</u> <75	17	62	0.047
>75	0	15	
<u>ET<sub>A</sub>R score</u> <75	6	38	0.063
>75	8	18	

**Πίνακας 13.** Histoscore και συσχέτιση με απάντηση σε χημειοθεραπεία

### 9.5 Συσχέτιση μεταξύ histoscore και σταδίου του νοσήματος

Στο πλαίσιο της παρούσας συσχέτισης δεδομένων οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε αυτές με νόσο σταδίου I (πρώιμη νόσος) και σε ασθενείς με νόσο σταδίου II- IV (τοπικά προχωρημένη νόσος) δεδομένης της διαφορετικής βιολογικής συμπεριφοράς της νόσου στα αντίστοιχα στάδια καθώς και των διαφορετικών

ενδεχομένως θεραπευτικών χειρισμών, καθώς νόσος σταδίου I αντιμετωπίζεται συνήθως μόνο χειρουργικά.

Επομένως, η κυτταροπλασματική έκφραση του NFκB (<100 έναντι > 100) συσχετιζόταν θετικά με το πρώιμο στάδιο της νόσου (I έναντι II-IV,  $p = 0,058$ ). Επιπλέον, το υψηλό histoscore CD-10 (<50 έναντι > 50) συσχετίστηκε με προχωρημένο στάδιο νόσου (I έναντι II-IV,  $p = 0,045$ ). Επιπρόσθετα, χαμηλότερα επίπεδα histoscore ET<sub>A</sub>R (<100 vs > 100) βρέθηκαν συχνότερα σε πρώιμο στάδιο (I έναντι II-IV,  $p = 0,042$ ). Όλες οι άλλες συγκρίσεις μεταξύ του histoscore και του σταδίου της νόσου δεν αποκάλυψαν καμία σημαντική συσχέτιση.

#### 9.6 Συσχέτιση μεταξύ histoscore και ιστολογικού υποτύπου επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών

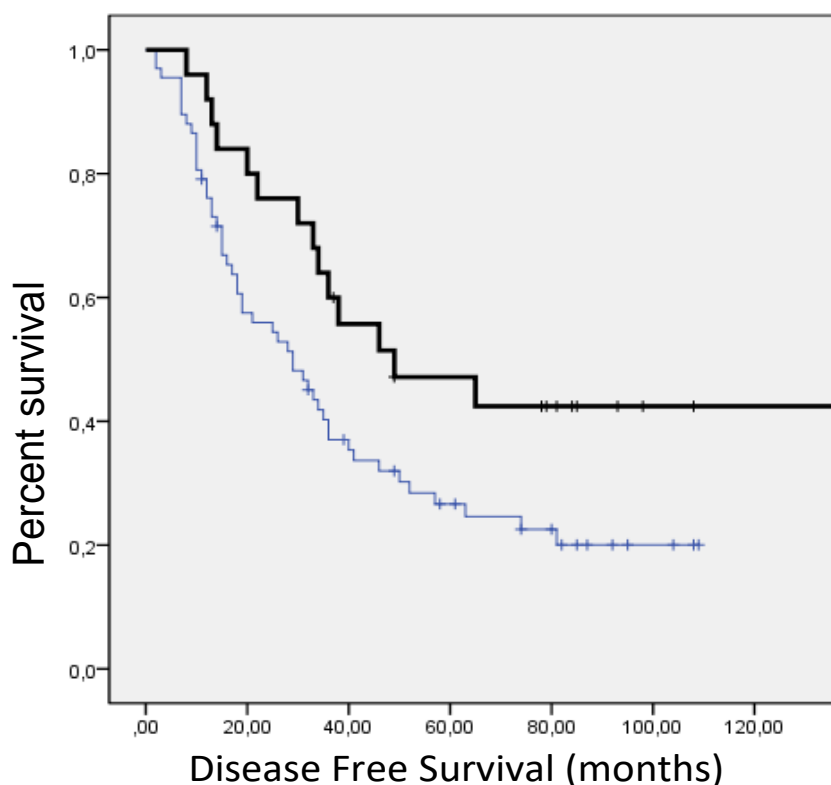
Η πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών στη μελέτη μας είχε ορώδη επιθηλιακό τύπο ( $n=54$  από τους 94 ασθενείς, 57,4%). Προκειμένου να μπορέσει να είναι εφικτή μια υποτυπώδης στατιστική ανάλυση και η εξαγωγή σίγουρα επισφαλών συμπερασμάτων (λόγω του μικρού αφενός δείγματος και της άνισης κατανομής αφετέρου των ιστολογικών υπότυπων), οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες: ασθενείς με ορώδη ιστολογία και ασθενείς χωρίς ορώδη ιστολογικό τύπο καρκίνου των ωοθηκών (όπου συμπεριλαμβάνονταν οι ενδομητριοειδείς, βλεννώδεις, διαυγοκυτταρικοί καθώς και οι μεικτοί όγκοι). Η στατιστική ανάλυση δείχνει ότι υψηλότερο NFκB κυτταροπλασματικό (> 100 έναντι <100) βρέθηκε συχνότερα σε ορώδη ιστολογικό καρκίνο (53/54 έναντι 33/40 μη ορώδων,  $p = 0,039$ ). Επιπλέον, η πυρηνική και η κυτταροπλασματική έκφραση του HIF-1a ήταν υψηλότερη σε μη ορώδη ιστολογικό υπότυπο (Πίνακας 14). Σε όλες τις άλλες συγκρίσεις, το histoscore του βιοδείκτη (πυρηνικό NFκB, CD-10, ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R) δεν συσχετίστηκε με τον ιστολογικό τύπο της νόσου.

Histoscore	Histological type		p value
	serous	Non serous	
<i>NFkB</i> cytoscore<100	1	53	0.039
>100	6	34	
HIF-1A cytoscore<75	25	29	0.035
>75	10	30	
HIF-1A cytoscore<100	30	24	0.048
>100	14	26	
HIF-1A nuclearscore<150	42	12	0.062
>150	24	16	
HIF-1A nuclearscore<200	51	3	0.049
>200	32	8	

**Πίνακας 14.** Histoscore και συσχέτιση με ιστολογικό τύπο

### 9.7 Συσχέτιση μεταξύ διαστήματος ελεύθερο νόσου (DFS) και *histoscore*

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των *NFkB*, HIF-1a, ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R δεν συσχετίστηκαν με το DFS των ασθενών. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση ήταν μεταξύ έκφρασης CD-10 και DFS. Οι ασθενείς με χαμηλό *histoscore* (<25) είχαν χειρότερο διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου (DFS) σε σύγκριση με τις ασθενείς με υψηλότερο *histoscore* CD-10 (> 25) (42,8 ± 4,8 έναντι 78,3 ± 11,9 μήνες,  $p = 0,032$ ). (Εικόνα 45)



**Εικόνα 46.** Έκφραση CD-10 και DFS. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier δείχνουν ότι οι ασθενείς με υψηλότερο histoscore είχαν καλύτερη διάστημα εκτός προόδου νόσου σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλότερο histoscore ( $78,3 \pm 11,9$  έναντι  $42,8 \pm 4,8$  μηνών,  $p = 0,032$ ).

### 9.8 Πολυπαραγοντική ανάλυση

Μετά από εκτίμηση της έκφρασης των NF-κB, HIF-1a, CD-10 και ET<sub>A</sub>R, του σταδίου της νόσου, του ιστολογικού τύπου και της πλατινοευαισθησίας της νόσου με μονοπαραγοντική ανάλυση, οι ανώτεροι παράγοντες εκτίμηθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες βάσει Cox regression. Για όλες τις εξετάσεις, το  $p < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η ισχυρή έκφραση NF-κB, HIF-1a και ET<sub>A</sub>R παρέμειναν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες ( $p < 0,0001$ ), καθώς επίσης και το στάδιο της νόσου και η απώλεια της ευαισθησίας στην πλατίνα ή πλατινοαντοχή. Η πυρηνική έκφραση του NF-κB, η έκφραση των ET<sub>A</sub>R, το στάδιο και ο ορώδης ιστολογικός τύπος είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση στη συνολική επιβίωση (υψηλότερος σχετικός κίνδυνος-hazard ratio).



	Univariate analysis	Multivariate analysis		
	P	p	HazardRatio	95% CI
NF-kB	0.048	<b>0.003</b>	<b>5.608</b>	1.83-17.19
HIF-1a	0.029	0.077	0.403	0.14-1.10
CD10	0.011	0.787	1.119	0.357-3.89
ET <sub>A</sub> R	0.026	<b>0.006</b>	<b>3.975</b>	1.47-10.72
STAGE	0.012	<b>0.014</b>	<b>3.607</b>	1.29-10.08
PLATINUM-RESISTANCE	<0.001	<b>&lt;0.001</b>	<b>9.055</b>	2.097-18.199
SEROUS TYPE	0.049	0.054	<b>2.78</b>	0.98-7.90

**Πίνακας 15.** Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση

### 9.9 Αλληλεπιδράσεις έκφρασης βιοδεικτών με επιβίωση

Δεδομένης της επίδρασης των παραπάνω μελετούμενων βιοδεικτών στη συνολική επιβίωση, αποφασίσαμε να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση ορισμένων από αυτούς τους βιοδείκτες με τη συνολική επιβίωση. Συγκεκριμένα διαπιστώσαμε πως ασθενείς με υψηλό histoscore NFκB και HIF-1a (αμφότερα με πυρηνικό πρότυπο κατανομής) (n=23) είχαν χειρότερη συνολική επιβίωση (OS) σε σύγκριση με αυτές με χαμηλό histoscore (n=22, p=0,003). Οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση CD10 και υψηλή ET<sub>A</sub>R (n=18) είχαν χειρότερη επιβίωση OS σε σύγκριση με εκείνες με υψηλή CD10 και χαμηλή έκφραση ET<sub>A</sub>R (n=41, p=0,022). Επιπλέον, οι ασθενείς με υψηλή έκφραση HIF-1a και χαμηλή CD10 (n = 24) είχαν επίσης χειρότερη επιβίωση OS σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλή έκφραση HIF-1a και υψηλή CD10 (n=18, p=0.002). Τέλος, οι ασθενείς με ένα «προφίλ» histoscore NFκB υψηλό / HIF-1a υψηλό / CD10 χαμηλό / υψηλό ET<sub>A</sub>R (n=9) έδωσαν τη χειρότερη συνολική επιβίωση (30,3 μήνες), γεγονός που μοιάζει να έχει κλινική σημασία καθώς επιβεβαιώνεται πως οι ασθενείς με ακριβώς αντίθετο προφίλ histoscore (NFκB χαμηλό / HIF-1a χαμηλό / CD10 υψηλό / ET<sub>A</sub>R χαμηλό) έχουν την καλύτερη πρόγνωση και άρα και επιβίωση (139,35 μήνες) (Πίνακας 16)

	Mean OS			
	Estimate (mo)	Std. Error	95% Confidence Interval	
			LowerBo und	UpperBo und
<b>CD10 low / ET<sub>A</sub>R high</b>	59,881	8,372	43,471	76,290
<b>CD10 high / ET<sub>A</sub>R low</b>	113,916	7,933	98,368	129,465
<b>NFkB low / HIF-1a low</b>	117,995	10,424	97,565	138,426
<b>NFkB high / HIF-1a high</b>	55,945	6,358	43,483	68,406
<b>HIF-1a low / CD10 high</b>	120,131	11,568	97,458	142,803
<b>NFkB high / CD10 low</b>	81,189	8,111	65,291	97,088
<b>NFkB low / CD10 high</b>	133,926	10,954	112,454	155,395
<b>HIF-1a high / CD10 low</b>	54,511	5,295	44,134	64,889
<b>NFkB low / HIF-1a low/ CD10 high / ET<sub>A</sub>R low</b>	139,345	11,453	100,234	162,458
<b>NFkB high / HIF-1a high/ CD10 low / ET<sub>A</sub>R high</b>	<u><b>30,32</b></u>	4,23	22.67	39.45

**Πίνακας 16.** Βιοδείκτες και επιβίωση

## Κεφάλαιο 10 Συζήτηση

### 10.1 Ευρήματα και κριτικός σχολιασμός βιβλιογραφίας

Παρόλο που οι γνωστοί παράγοντες με κλασική προγνωστική σημασία προέρχονται κυρίως από δεδομένα που προκύπτουν από την κλινική και παθολογοανατομική σταδιοποίηση, πλέον η γνώση της μοριακής συμπεριφοράς

ενός όγκου δυνητικά μπορεί να αποτελέσει ένα θεμελιώδες βήμα για τον εντοπισμό κατηγοριών υψηλού κινδύνου ασθενών, καθώς και για την πρόβλεψη κλινικών αποτελεσμάτων οδηγώντας σε αυτό που καλούμε σήμερα «εξατομικευμένη ιατρική» (personalized medicine). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, τα τελευταία χρόνια, οι στοχεύουσες θεραπείες έχουν γίνει αναπόσπαστο μέρος της καθημερινής πρακτικής, σε μια προσπάθεια να ανασταλούν συγκεκριμένες οδοί καρκινογένεσης. Σε αυτή τη μελέτη ερευνήσαμε το πρότυπο έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και HIF-1a, της πεπτιδάσης CD-10 που καταλύει την ενδοθηλίνη, καθώς και των υποδοχέων τύπου A και B της ενδοθηλίνης (ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R) σε επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών.

Αρχικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών έχει ανιχνεύσιμη έκφραση πυρηνικού NF-κB, γεγονός που συσχετίστηκε με πιο επιθετική νόσο (λόγω της συσχέτισης με χειρότερη τόσο συνολική επιβίωση όσο και χειρότερο διάστημα χωρίς πρόοδο της νόσου (OS και PFS). Μελετήσαμε τόσο την κυτταροπλασματική όσο και την πυρηνική έκφραση του NF-κB. Όταν το NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, θεωρείται ότι βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας, ανενεργό, ενώ όταν μεταφέρεται στον πυρήνα, ακολουθώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι που πυροδοτείται από την ενεργοποίηση των TLR (toll like receptors), θεωρείται ότι είναι ενεργοποιημένος (255). Ο NF-κB κατέχει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των στοχευόμενων γονιδίων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως ανοσοανταπόκρισης, κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, η ανίχνευση της κυτταροπλασματικής έκφρασης του NF-κB έχει μικρή σημασία, καθώς αντιπροσωπεύει την ανενεργή μορφή αυτού του αντι-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα, ενώ η πυρηνική έκφραση αντιπροσωπεύει την ενεργοποιημένη μορφή αυτού του παράγοντα, γεγονός που μεταφράζεται και σε χειρότερη πρόγνωση και άρα μικρότερη επιβίωση. Το εύρημα μας συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες, η πλειοψηφία των οποίων υποστηρίζει ότι οι ασθενείς με καρκίνο που εκφράζουν πυρηνικό NF-κB έχουν μικρότερη συνολική επιβίωση.

Επιπλέον, η μελέτη μας δείχνει ότι η έκφραση του HIF-1a, στην αντίστοιχη ομάδα των ασθενών, συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση και επίσης με αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Είναι καλά αποδεδειγμένο ότι η υποξία είναι συνήθης κατάσταση κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης και πολλοί τύποι υποξικών

καρκινικών κυττάρων ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια προκειμένου να πραγματοποιηθούν βασικές διεργασίες που θα προάγουν τελικά την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν την οδό του HIF-1a ως ένα μονοπάτι δυνητικά στοχεύσιμο στο πλαίσιο της εξατομικευμένης ιατρικής (256).

Αν και τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών είναι διφορούμενα, η πιο διαδεδομένη πεποίθηση είναι ότι η πυρηνική έκφραση του HIF-1a σχετίζεται με κακή πρόγνωση και χειρότερη επιβίωση ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας (257)(258)(259)(185). Σε προηγούμενη μελέτη βρέθηκε πως ο διαυγοκυτταρικός καρκίνος ωοθηκών είχε την υψηλότερη έκφραση HIF-1a σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ιστολογικούς υπότυπους (260), ενώ σε άλλες δεν κατάφερε να αποδειχθεί συσχέτιση μεταξύ ιστολογικού υπότυπου και HIF-1a (259). Επιπλέον, σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, μελέτες δείχνουν ότι ο HIF-1a υπερεκφράζεται στην πλειονότητα των υποξικών μεταστατικών όγκων και η έκφρασή του σχετίζεται με εμφάνιση χημειοαντίστασης (259)(185)(261)(262)(263). Στις κυτταρικές σειρές, η έκφραση του HIF-1a μείωσε την απόπτωση που προκαλείται από cisplatin σε ευαίσθητα κύτταρα, ενώ η γενετική αποσιώπηση (knock down) του HIF-1a ενίσχυσε την ανταπόκριση στη σισπλατίνη τόσο σε πλατινοευαίσθητα όσο και σε πλατινοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα ωοθηκών (264).

Επίσης, δείξαμε ότι η έκφραση του CD-10 σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών είναι ένας καλός δείκτης πρόγνωσης και ευαισθησίας στη χημειοθεραπεία. Η υψηλή έκφραση του CD-10 συσχετίστηκε με καλύτερο OS και DFS των ασθενών και επίσης με καλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Επίσης, η έκφραση CD10 μειώνεται σημαντικά σε όγκους υψηλού βαθμού κακοηθείας, είτε αναφερόμαστε σε επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, είτε σε άλλες κακοήθειες (265)(266)(267). Τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να μας οδηγήσουν δειλά στο συμπέρασμα πως υψηλά επίπεδα CD-10 μπορούν να μειώσουν το ρυθμό προόδου της νόσου και να παρατείνουν το προσδόκιμο επιβίωσης, μέσω πάντα χορήγησης χημειοθεραπείας (265). Ο ακριβής ρόλος που διαδραματίζει το CD-10 στην εξέλιξη του καρκίνου είναι διφορούμενος. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι το CD10 ως μόριο καταστολής ογκογένεσης σε ορισμένους όγκους συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνωματος των ωοθηκών. Επίσης, σε ορισμένες αναφορές, το CD10 διαδραματίζει βασικό ρόλο στην εξέλιξη της νεοπλασίας, μέσω αποικοδόμησης ή επαναδιαμόρφωσης ειδικών υποστρωμάτων του ενζύμου,

συμπεριλαμβανομένης της ενδοθηλίνης-1 και άλλων αυξητικών παραγόντων σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου (268)(269)(270).

Τα ευρήματά μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες. Το CD10 φαίνεται να χρησιμοποιείται ως δείκτης με μεγάλη ευαισθησία, ικανός για την ταυτοποίηση φυσιολογικών και άτυπων-παθολογικών στρωματικών ενδομητρικών κυττάρων (271). Άλλες μελέτες ανέφεραν ότι τα περισσότερα από τα μυοδιηθητικά καρκινώματα του ενδομητρίου εξέφραζαν CD10, ενώ θεωρείται πως αυτός ο δείκτης μπορεί να διακρίνει τα άτυπα πολυποειδή αδеноμώματα από τα καρκινώματα του ενδομητρίου (271)(272)(273). Στο καρκίνωμα των ωοθηκών το CD10 εκφράστηκε τόσο σε καρκινικά κύτταρα όσο και σε στρωματικά κύτταρα, αν και η ένταση της χρώσης κυμαίνεται μεταξύ των ιστών. Σε μια άλλη μελέτη, η έκφραση του CD10 ήταν μικρότερη σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών με όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας, εύρημα που ταυτίζεται με τα αποτελέσματά μας (274). Επίσης, διαπιστώσαμε ότι η έκφραση του CD10 συσχετίζεται με καλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, σε συμφωνία με άλλες μελέτες όπου η έκφραση του CD10 αύξησε την ευαισθησία στην πακλιταξέλη (265)(271), ίσως μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης FAK, αναγκαίας διαδικασίας για την κυτταρική «μετανάστευση» μέσω του σχηματισμού μικροσωληνίσκων του κυτταρικού σκελετού (270)(275). Αυτή η μελέτη έδειξε επίσης πως υπήρξε σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διεισδυτικότητας στα CD10-επιμολυσμένα κύτταρα καρκινώματος ωοθηκών και έτσι η υπερέκφραση του CD10 ίν νίνο μπορεί να μειώσει την ογκογένεση στις κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών (265). Το εάν το CD10 είναι κάτι περισσότερο από ένας δείκτη πρόγνωσης της συνολικής επιβίωσης και ανταπόκρισης στη χορηγούμενη θεραπεία ή μπορεί ακόμα και να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός στόχος της χορηγούμενης θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, απαιτεί περαιτέρω μελέτες.

Επιπλέον, η μελέτη μας έδειξε ότι η έκφραση του υποδοχέα ET<sub>A</sub>R, αλλά όχι του αντίστοιχου ET<sub>B</sub>R, καταδεικνύει μια χειρότερη πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, καθώς η υψηλή έκφραση του ET<sub>A</sub>R συσχετίζεται με χειρότερη συνολική επιβίωση (OS), αντίσταση στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία και παρουσία πιο προχωρημένου σταδίου της νόσου. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η ενεργοποίηση του υποδοχέα A της ενδοθηλίνης-1 μπορεί να προάγει την ογκογένεση και την εξέλιξη του όγκου μέσω

διαφόρων μηχανισμών, κυρίως αγγειογένεση αλλά και πολλαπλασιασμό, διεισδυτικότητα και αναστολή της απόπτωσης, στρωματική αντίδραση, μεσεγχυματική μετατροπή από επιθηλιακό ιστό (Epithelial to Mesenchymal Transition-EMT), μεταστάσεις και αντοχή στο φάρμακο (276)(277)(278)(279).

Όλα τα επαγόμενα αποτελέσματα από τη δράση του άξονα ενδοθηλίνης στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, πραγματοποιούνται μέσω της δράσης της ενδοθηλίνης επιλεκτικά στους υποδοχείς A (ET<sub>A</sub>R), ενώ η υπερέκφραση των υποδοχέων B (ET<sub>B</sub>R) δεν είναι σπάνιο εύρημα. Αυτοί μπορούν να ανιχνευθούν σε μελάνωμα, γλοιοβλάστωμα, πολλαπλό μύελωμα και σπάνια στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού (276). Έτσι, τα παραπάνω δείχνουν ότι η έκφραση του υποδοχέα διαμέσω του οποίου πραγματοποιείται η δράση της ET-1, εξαρτάται αυστηρά από τον τύπο του κυττάρου. Σύμφωνα με αυτή λοιπόν την παρατήρηση, τα συμπεράσματά μας ότι η έκφραση του ET<sub>B</sub>R ήταν χαμηλότερη από του ET<sub>A</sub>R και δεν συσχετίστηκε με την επιβίωση ή την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών ήταν συμβατά με προηγούμενες παρατηρήσεις. Επίσης, τα ευρήματά μας που αφορούν την έκφραση του ET<sub>A</sub>R είναι συμβατά με τα ευρήματα στον επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, όπου η έκφραση της ενδοθηλίνης και του ET<sub>A</sub>R σχετίζονται σημαντικά με την νεοαγγειογένεση και την έκφραση του VEGF (238)(280)(281). Αυτή η έκφραση του VEGF με τη σειρά της διεγείρει την ανάπτυξη και την αγγειογένεση αυξάνοντας τα επίπεδα του HIF-1a με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση (281). Επιπλέον, η υποξία μπορεί να επάγει τη μεταγραφή της ενδοθηλίνης σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων (282)(283). Υπάρχει επίσης ένα λειτουργικό στοιχείο απόκρισης υποξίας που δρα στον υποκινητή της ET-1 (284)(285) και η επαγωγή έκφρασης ενδοθηλίνης από υποξία είναι πιθανώς μέσω του HIF-1 (286). Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε επίσης ότι η ενδοθηλίνη είναι παρούσα σε υψηλή συγκέντρωση στον ασκίτη ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτό το μόριο θα μπορούσε να συμμετέχει στην πρόοδο και την εισβολή του καρκινώματος των ωοθηκών (287). Όλα αυτά τα δεδομένα δείχνουν σαφώς ότι η έκφραση του ET<sub>A</sub>R σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση και ταχεία πρόοδο της νόσου.

Έχουμε επίσης δείξει ότι οι ασθενείς με υψηλή έκφραση του ET<sub>A</sub>R είχαν αντίσταση στην πλατίνα. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες (288). Σε μία από αυτές τις μελέτες, όταν οι συγγραφείς στόχευσαν το ET<sub>A</sub>R με ανταγωνιστή (zibotentan) σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, διαπίστωσαν ότι η

συγχορήγηση μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα σε κλασικά χημειοθεραπευτικά σχήματα (288). Αυτό πιθανόν να επιτυγχάνεται μέσω αναστολής σηματοδότησης του μονοπατιού διαφυγής από επιθηλιακό ιστό σε μεσεγχυματικό (Epithelial Mesenchymal Transition). Στα καρκινικά κύτταρα ωοθήκης, ορισμένοι ανταγωνιστές ET<sub>A</sub>R, αναστέλλουν *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς και την κυτταροπροστατευτικό ρόλο έναντι της δράσης της πακλιταξέλης, η οποία επιτυγχάνεται μέσω του μονοπατιού της ενδοθηλίνης (276).

### *Κεφάλαιο 11 Συμπεράσματα*

Η μελέτη μας σχεδιάστηκε για να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος του άξονα CD-10 / ενδοθηλίνης καθώς και οι οδοί NFκB και HIF-1a σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και να διερευνηθεί το αν η έκφραση αυτών των βιοδεικτών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προβλεπτικός παράγοντας επιβίωσης και αντοχής στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία. Στην πραγματικότητα, οι ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών εμφάνισαν έναν σαφώς διαφορετικό χάρτη έκφρασης βιοδεικτών σε ιστό εγκλεισμένο σε κύβο παραφίνης, ενώ φάνηκε πως αυτές οι διαφορές επηρεάζουν τη συνολική επιβίωση και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες.

Η συγκεκριμένη μελέτη καταδεικνύει *in vivo*, σύμφωνα με πραγματικά κλινικά δεδομένα και μακροχρόνια παρακολούθηση, έναν πιθανό προγνωστικό και ταυτόχρονα λειτουργικό ρόλο του CD10 στο μονοπάτι καρκινογένεσης του επιθηλιακού καρκινώματος των ωοθηκών μέσω της σύνδεσής του με τον άξονα ενδοθηλίνης-υποδοχέων ενδοθηλίνης (άξονας ET-1 / ET<sub>A</sub>R).

Τέλος, η πυρηνική έκφραση γνωστών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο HIF-1a και ο NF-κB, αποδεικνύεται πιθανός προγνωστικός βιοδείκτης που σχετίζεται με την κλινική έκβαση καθώς και πιθανός προβλεπτικός παράγοντας χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα. Η στόχευση των οδών HIF-1a και NF-κB ήταν μια πολλά υποσχόμενη πρόοδος τα τελευταία χρόνια (256).

Είναι προφανές ότι τα αποτελέσματά μας πρέπει να επαληθευθούν σε μεγαλύτερες και προοπτικές μελέτες, ενώ θα πρέπει επίσης να εντοπιστούν οι τρόποι με τους οποίους εμπλέκονται και αλληλεπιδρούν οι τρεις αυτές βιοχημικές οδοί (CD10 / ενδοθηλίνη, HIF-1a και NFκB). Εάν επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να σχεδιάσουμε μελέτες που να εξετάζουν τα

φάρμακα που στοχεύουν τις προαναφερθείσες οδούς (λαμβάνοντας υπόψη τη διαθεσιμότητα ανταγωνιστών ET<sub>A</sub>R ή πολλαπλών παραγόντων που στοχεύουν στην αντιαγγειογένεση, στην οποία ο HIF-1a κατέχει ενορχηστρικό ρόλο μέσω του VEGF / RAS / RAF / MAPK ή VEGF / PI3K / Akt μονοπατιού), ειδικά σε όγκους με πιο επιθετική βιολογία, στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής με στόχο τη χορήγηση εξατομικευμένης στοχεύουσας θεραπείας.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2008;49(2):1,33-64. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10200776](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10200776)
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019;69(1):7–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30620402>
3. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* (80- ). 2003;302(5645):643–6.
4. Howell EA, Egorova N, Hayes MP, Wisnivesky J, Franco R, Bickell N. Racial disparities in the treatment of advanced epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2013;122(5):1025–32.
5. Crijnen TEM, Janssen-Heijnen MLG, Gelderblom H, Morreau J, Nooij MA, Kenter GG, et al. Survival of patients with ovarian cancer due to a mismatch repair defect. *Fam Cancer*. 2005;4(4):301–5.
6. Stewart SL, Wike JM, Foster SL, Michaud F. The incidence of primary fallopian tube cancer in the United States. *Gynecol Oncol*. 2007;107(3):392–7.
7. Manley G. Public Access NIH Public Access. 2013;71(2):233–6.
8. Kammerman S, Demopoulos RI, Ross J. Gonadotropin Receptors in Experimentally Induced Ovarian Tumors in Mice. *Cancer Res*. 1977;37(August):2578–82.
9. Whiteman DC, Murphy MFG, Cook LS, Cramer DW, Hartge P, Marchbanks PA, et al. RESPONSE: Re: Multiple Births and Risk of Epithelial Ovarian Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2002;93(4):319–20.
10. Gates MA, Rosner BA, Hecht JL, Tworoger SS. Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. *Am J Epidemiol*. 2010;171(1):45–53.
11. Ness RB, Cramer DW, Goodman MT, Kjaer SK, Mallin K, Mosgaard BJ, et al. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: A pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2002;155(3):217–24.

12. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: A pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol* [Internet]. 2012;13(4):385–94. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70404-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70404-1)
13. Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I, Moerman P. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(2):349–71.
14. Chittenden B, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2010;19(3):398–405. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60175-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60175-7)
15. Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Russell P, Hacker NF, Ward BG, et al. Hormone replacement therapy and risk of epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 1999;81(3):559–63.
16. Pennington KP, Swisher EM. Hereditary ovarian cancer: Beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2012;124(2):347–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.12.415>
17. Kauff ND, Mitra N, Robson ME, Hurley KE, Chuai S, Goldfrank D, et al. Risk of ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation-negative hereditary breast cancer families. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(18):1382–4.
18. Bolton KL<sup>1</sup>, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus SJ, Karlan BY, Lambrechts D, Despierre E, Barrowdale D, McGuffog L, Healey S, Easton DF, Sinilnikova O, Benítez J, García MJ, Neuhausen S, Gail MH, Hartge P, Peock S, Frost D, Evans DG, Eeles R, Godw PPE kConFab ICGARN. in *Women with Invasive Epithelial Ovarian Cancer*. 2013;307(4):382–90.
19. Cass I, Baldwin RL, Varkey T, Moslehi R, Narod SA, Karlan BY. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003;97(9):2187–95.
20. McLaughlin JR, Rosen B, Moody J, Pal T, Fan I, Shaw PA, et al. Long-term ovarian cancer survival associated with mutation in BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(2):141–8.
21. Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F, Flanagan A, Arnout L, Merrett S, et al. Pathology of Ovarian Cancers in BRCA1 and BRCA2 Carriers. *Clin*

- Cancer Res. 2004;10(7):2473–81.
22. Levine DA, Argenta PA, Yee CJ, Marshall DS, Olvera N, Bogomolny F, et al. Fallopian tube and primary peritoneal carcinomas associated with BRCA mutations. *J Clin Oncol*. 2003;21(22):4222–7.
  23. Song H, Dicks E, Ramus SJ, Tyrer JP, Intermaggio MP, Hayward J, et al. Contribution of germline mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D genes to ovarian cancer in the population. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2901–7.
  24. Aziz S, Kuperstein G, Rosen B, Cole D, Nedelcu R, McLaughlin J, et al. A genetic epidemiological study of carcinoma of the fallopian tube. *Gynecol Oncol*. 2001;80(3):341–5.
  25. Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM. Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):1122–9.
  26. Crawford LB. Perineal Talc Use and Risk of Endometrial Cancer in Postmenopausal Women. 2014;(February).
  27. Riska A, Martinsen JI, Kjaerheim K, Lynge E, Sparen P, Tryggvadottir L, et al. Occupation and risk of primary Fallopian tube carcinoma in Nordic countries. *Int J Cancer*. 2012;131(1):186–92.
  28. Blank MM, Wentzensen N, Murphy MA, Hollenbeck A, Park Y. Dietary fat intake and risk of ovarian cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;106(3):596–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.572>
  29. Mommers M, Schouten LJ, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA. Dairy consumption and ovarian cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *Br J Cancer*. 2006;94(1):165–70.
  30. Myung SK, Ju W, Choi HJ, Kim SC. Soy intake and risk of endocrine-related gynaecological cancer: A meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2009;116(13):1697–705.
  31. Moorman PG, Jones LW, Akushevich L, Schildkraut JM. Recreational Physical Activity and Ovarian Cancer Risk and Survival. *Ann Epidemiol* [Internet]. 2011;21(3):178–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2010.10.014>
  32. Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: A systematic review and

- meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2007;43(4):690–709.
33. Lin HW, Tu YY, Lin SY, Su WJ, Lin WL, Lin WZ, et al. Risk of ovarian cancer in women with pelvic inflammatory disease: A population-based study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2011;12(9):900–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70165-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70165-6)
  34. Group C, Studies E, Cancer O. Articles Ovarian cancer and oral contraceptives : collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and. 2016;303–14.
  35. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics Relating to ovarian Cancer Risk: Collaborative Analysis of 12 US case-Control Studies. *Am J Epidemiol*. 2017;136(10):1212–20.
  36. Cibula D, Widschwendter M, Májek O, Dusek L. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: Review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(1):55–67.
  37. Ip S, Chung M, Raman G, Trikalinos TA, Lau J. A Summary of the Agency for Healthcare Research and Quality’s Evidence Report on Breastfeeding in Developed Countries. *Breastfeed Med*. 2009;4(s1):S-17-S-30.
  38. Edmondson RJ, Monaghan JM. Ovarian Cancer The Epidemiology of Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2001;11(3):423–9.
  39. Kurman RJ, Shih L-M. The Origin and Pathogenesis. *Am J Surgery*,. 2011;34(3):433–43.
  40. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.10).
  41. Gurung A, Hung T, Morin J, Gilks CB. Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: Clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology*. 2013;62(1):59–70.
  42. Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, Lynch AG, Riad M, Sharma R, et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol*. 2010;221(1):49–56.
  43. Soslow RA, Han G, Park KJ, Garg K, Olvera N, Spriggs DR, et al. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2012;25(4):625–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2011.183>
  44. Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, Fuks F, Bye J, Chin S, et al. EMSY

- Links the BRCA2 Pathway. *Cell*. 2003;115(5):523–35.
45. Nakayama K, Nakayama N, Kurman RJ, Cope L, Pohl G, Samuels Y, et al. Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(7):779–85.
  46. Khabele D, Fadare O, Liu AY, Wilson AJ, Wass E, Osteen K, et al. An orthotopic model of platinum-sensitive high grade serous fallopian tube carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(1):37–45.
  47. Tan DSP, Kaye S. Ovarian clear cell adenocarcinoma: A continuing enigma. *J Clin Pathol*. 2007;60(4):355–60.
  48. Kato N, Sasou SI, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol*. 2006;19(1):83–9.
  49. Reisman D, Glaros S, Thompson EA. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* [Internet]. 2009;28(14):1653–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.4>
  50. Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2009;1795(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.05.005>
  51. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, Soukup D, Resnick R, Sarma K, et al. Public Access NIH Public Access. *PLoS One*. 2017;32(7):736–40.
  52. Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Iwaya K, Tamai S, Matsubara O. PIK3CA mutation is an early event in the development of endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma. *J Pathol*. 2011;225(2):189–94.
  53. Anglesio MS, George J, Kulbe H, Friedlander M, Rischin D, Lemech C, et al. IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(8):2538–48.
  54. Swenerton KD, Santos JL, Gilks CB, Köbel M, Hoskins PJ, Wong F, et al. Histotype predicts the curative potential of radiotherapy: The example of ovarian cancers. *Ann Oncol*. 2011;22(2):341–7.
  55. Catasús L, Bussaglia E, Rodríguez I, Gallardo A, Pons C, Irving JA, et al. Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: Similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of

- microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum Pathol.* 2004;35(11):1360–8.
56. Kuo KT, Mao TL, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang TL, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1597–601.
  57. Stewart CJR, Brennan BA, Chan T, Natreba J. WT1 expression in endometrioid ovarian carcinoma with and without associated endometriosis. *Pathology.* 2008;40(6):592–9.
  58. Köbel M, Kalloger SE, Santos JL, Huntsman DG, Gilks CB, Swenerton KD. Tumor type and substage predict survival in stage I and II ovarian carcinoma: Insights and implications. *Gynecol Oncol [Internet].* 2010;116(1):50–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.029>
  59. Vang R, Gown AM, Wu LSF, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, et al. Immunohistochemical expression of CDX2 in primary ovarian mucinous tumors and metastatic mucinous carcinomas involving the ovary: Comparison with CK20 and correlation with coordinate expression of CK7. *Mod Pathol.* 2006;19(11):1421–8.
  60. Tabrizi AD, Kalloger SE, Köbel M, Cipollone J, Roskelley CD, Mehl E, et al. Primary ovarian mucinous carcinoma of intestinal type: Significance of pattern of invasion and immunohistochemical expression profile in a series of 31 cases. *Int J Gynecol Pathol.* 2010;29(2):99–107.
  61. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: A clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer.* 1997;79(8):1581–6.
  62. McAlpine JN, Wiegand KC, Vang R, Ronnett BM, Adamiak A, Köbel M, et al. HER2 overexpression and amplification is present in a subset of ovarian mucinous carcinomas and can be targeted with trastuzumab therapy. *BMC Cancer.* 2009;9:1–12.
  63. Singer G, Iii RO, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. BRIEF Mutations in BRAF and KRAS Characterize the. *Communication.* 2003;95(6):6–8.
  64. Wong KK, Tsang YTM, Deavers MT, Mok SC, Zu Z, Sun C, et al. BRAF mutation is rare in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinomas. *Am J Pathol [Internet].* 2010;177(4):1611–7. Available from:

<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100212>

65. Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell*. 2006;10(1):25–38.
66. Kurman RJ, Shih IM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer - Shifting the paradigm. *Hum Pathol* [Internet]. 2011;42(7):918–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003>
67. Gershenson DM, Sun CC, Iyer RB, Malpica AL, Kavanagh JJ, Bodurka DC, et al. Hormonal therapy for recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2012;125(3):661–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.02.037>
68. Quinn MA, Anderiesz C. Screening for ovarian cancer. *Med J Aust*. 2003;178(12):655–6.
69. BW M, Bayram N, JG L, MA W, MY B, F van der V, et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 1998;70(6):1101–8.
70. Johnson CC, Kessel B, Riley TL, Ragard LR, Williams CR, Xu JL, et al. The epidemiology of CA-125 in women without evidence of ovarian cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2008;110(3):383–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.05.006>
71. Sjövall K, Nilsson B, Einhorn N. The significance of serum CA 125 elevation in malignant and nonmalignant diseases. *Gynecol Oncol*. 2002;85(1):175–8.
72. Black A, Buys S, Berg CD. Ovarian cancer screening and mortality - Reply. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;306(14):1544–5.
73. Burg MEL van der, Lent M Van, Buyse M, Kobierska A, Colombo N, Favalli G, et al. the Effect of Debulking Surgery After Induction Chemotherapy on the. *N Engl J Med*. 1995;332(10):629.
74. Cass I, Li AJ, Runowicz CD, Fields AL, Goldberg GL, Leuchter RS, et al. Pattern of lymph node metastases in clinically unilateral stage I invasive epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2001;80(1):56–61.
75. Maggioni A, Panici PB, Dell’Anna T, Landoni F, Lissoni A, Pellegrino A, et al.

- Randomised study of systematic lymphadenectomy in patients with epithelial ovarian cancer macroscopically confined to the pelvis. *Br J Cancer*. 2006;95(6):699–704.
76. Fruscio R, Corso S, Ceppi L, Garavaglia D, Garbi A, Floriani I, et al. Conservative management of early-stage epithelial ovarian cancer: Results of a large retrospective series. *Ann Oncol*. 2013;24(1):138–44.
  77. Bois A Du, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the arbeitgemeinschaft gynaekologische onkologie studien-gruppe ovarialkarzin. *Cancer*. 2009;115(6):1234–44.
  78. Aletti GD, Dowdy SC, Gostout BS, Jones MB, Stanhope RC, Wilson TO, et al. Quality Improvement in the Surgical Approach to Advanced Ovarian Cancer: The Mayo Clinic Experience. *J Am Coll Surg* [Internet]. 2009;208(4):614–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2009.01.006>
  79. Du Bois A, Reuss A, Harter P, Pujade-Lauraine E, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Potential role of lymphadenectomy in advanced ovarian cancer: A combined exploratory analysis of three prospectively randomized phase III multicenter trials. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1733–9.
  80. Panici PB, Maggioni A, Hacker N, Landoni F, Ackermann S, Campagnutta E, et al. Systematic aortic and pelvic lymphadenectomy versus resection of bulky nodes only in optimally debulked advanced ovarian cancer: A randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(8):560–6.
  81. Harter P, Sehouli J, Lorusso D, Reuss A, Vergote I, Marth C, et al. A Randomized Trial of Lymphadenectomy in Patients with Advanced Ovarian Neoplasms. *N Engl J Med*. 2019;380(9):822–32.
  82. Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIc or IV Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(10):943–53.
  83. Rose PG, Nerenstone S, Brady MF, Clarke-Pearson D, Olt G, Rubin SC, et al. Secondary Surgical Cytoreduction for Advanced Ovarian Carcinoma. *N Engl J Med*. 2004;351(24):2489–97.



84. Zang RY, Harter P, Chi DS, Sehouli J, Jiang R, Tropé CG, et al. Predictors of survival in patients with recurrent ovarian cancer undergoing secondary cytoreductive surgery based on the pooled analysis of an international collaborative cohort. *Br J Cancer*. 2011;105(7):890–6.
85. Du Bois A, Vergote I, Ferron G, Reuss A, Meier W, Gregg S, et al. Randomized controlled phase III study evaluating the impact of secondary cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer: AGO DESKTOP III/ENGOT ov20. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 May 20;35(15\_suppl):5501. Available from: [https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15\\_suppl.5501](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.5501)
86. Coleman RL, Enserro D, Spirtos N, Herzog TJ, Sabbatini P, Armstrong DK, et al. A phase III randomized controlled trial of secondary surgical cytoreduction (SSC) followed by platinum-based combination chemotherapy (PBC), with or without bevacizumab (B) in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer (PSOC): A NRG Oncology/Gynecologic. *J Clin Oncol* [Internet]. 2018 May 20;36(15\_suppl):5501. Available from: [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15\\_suppl.5501](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.5501)
87. Fotopoulou C, Zang R, Gultekin M, Cibula D, Ayhan A, Liu D, et al. Value of tertiary cytoreductive surgery in epithelial ovarian cancer: An international multicenter evaluation. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(4):1348–54.
88. Ba W, Hc K, Ta L. Adjuvant ( post-surgery ) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer ( Review ). 2012;(3).
89. Swart AC. Long-term follow-up of women enrolled in a randomized trial of adjuvant chemotherapy for early stage ovarian cancer (ICON1). *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Jun 20;25(18\_suppl):5509. Available from: [https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2007.25.18\\_suppl.5509](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2007.25.18_suppl.5509)
90. Chan JK, Tian C, Fleming GF, Monk BJ, Herzog TJ, Kapp DS, et al. The potential benefit of 6 vs. 3 cycles of chemotherapy in subsets of women with early-stage high-risk epithelial ovarian cancer: An exploratory analysis of a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2010;116(3):301–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.10.073>
91. Neijt JP, Engelholm SA, Tuxen MK, Sørensen PG, Hansen M, Sessa C, et al. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(17):3084–92.

92. Bookman MA, Brady MF, McGuire WP, Harper PG, Alberts DS, Friedlander M, et al. Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: A phase III trial of the gynecologic cancer intergroup. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1419–25.
93. Pignata S, Scambia G, Ferrandina G, Savarese A, Sorio R, Breda E, et al. Carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin as first-line treatment for patients with ovarian cancer: The MITO-2 randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(27):3628–35.
94. Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, Gabra H, Coleman R, Atkinson R, et al. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(22):1682–91.
95. Coleman RL. Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer. *Yearb Obstet Gynecol Women's Heal*. 2008;2007:411–3.
96. Hess LM, Benham-Hutchins M, Herzog TJ, Hsu CH, Malone DC, Skrepnek GH, et al. A meta-analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front-line treatment of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(3):561–70.
97. Katsumata N, Yasuda M, Takahashi F, Isonishi S, Jobo T, Aoki D, et al. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet [Internet]*. 2009;374(9698):1331–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61157-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61157-0)
98. Katsumata N, Yasuda M, Isonishi S, Takahashi F, Michimae H, Kimura E, et al. Long-term results of dose-dense paclitaxel and carboplatin versus conventional paclitaxel and carboplatin for treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer (JGOG 3016): A randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Oncol [Internet]*. 2013;14(10):1020–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70363-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70363-2)
99. Hook J, Stenning SP, Brenton J, Kaye SB, McNeish IA, Naik R, et al. ICON8: An international randomized trial comparing two dose-dense regimens, 3-weekly carboplatin plus weekly paclitaxel (CwT), and weekly carboplatin-paclitaxel (wCwT), to standard 3-weekly treatment in women with newly

- diagnosed ovarian, fallopian tube, . J Clin Oncol [Internet]. 2014 May 20;32(15\_suppl):TPS5611–TPS5611. Available from: [https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.tps5611](https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.tps5611)
100. Burger RA, Enserro D, Tewari KS, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, et al. Final overall survival (OS) analysis of an international randomized trial evaluating bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced ovarian cancer: A NRG oncology/Gynecologic Oncology Group (GOG) study. J Clin Oncol [Internet]. 2018 May 20;36(15\_suppl):5517. Available from: [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15\\_suppl.5517](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.5517)
  101. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, et al. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2011;365(26):2484–96.
  102. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): Overall survival results of a phase 3 randomised trial. Lancet Oncol. 2015;16(8):928–36.
  103. Friedlander M, Trimble E, Tinker A, Alberts D, Avall-Lundqvist E, Brady M, et al. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer. 2011;21(4):771–5.
  104. Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye JF, Kristensen GB, Wheeler S, Swart AM, Qian W, Torri V, Floriani I, Jayson G, Lamont A TCI and AC. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. Lancet [Internet]. 2016;361(9375):2099–106. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13718-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13718-X)
  105. Pujade-Lauraine E, Wagner U, Aavall-Lundqvist E, GebSKI V, Heywood M, Vasey PA, et al. Pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. J Clin Oncol. 2010;28(20):3323–9.
  106. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer. J Clin Oncol. 2010;28(19):3107–14.
  107. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, et

- al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1302–8.
108. Rustin GJS, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, et al. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating recist 1.1 and CA 125 agreed by the gynecological cancer intergroup (GCIG). *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(2):419–23.
109. Rustin GJ, van der Burg ME. A randomized trial in ovarian cancer (OC) of early treatment of relapse based on CA125 level alone versus delayed treatment based on conventional clinical indicators (MRC OV05/EORTC 55955 trials). *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Jun 20;27(18\_suppl):1. Available from: [https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.18\\_suppl.1](https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.18_suppl.1)
110. BEINKE S, LEY SC. Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochem J* [Internet]. 2004;382(2):393–409. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20040544>
111. Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, et al. Unravelling the complexities of the NF- $\kappa$ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*. 2006;25(51):6781–99.
112. Sen R, Baltimore D. Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986;47(6):921–8.
113. Karin M, Greten FR. NF- $\kappa$ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(10):749–59.
114. Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- $\kappa$ B: Variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(19):2964–78.
115. Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725–34.
116. Gilmore TD. N $\kappa$ B, K $\kappa$ FI, dorsal, and related Matters. *Cell* [Internet]. 1990;62:841–643. Available from: [https://ac.els-cdn.com/009286749090257F/1-s2.0-009286749090257F-main.pdf?\\_tid=spdf-afb3a927-8231-4aa7-bb88-85321ae3feeb&acdnat=1519911643\\_a749a7cb42633fb4085505226c15546c](https://ac.els-cdn.com/009286749090257F/1-s2.0-009286749090257F-main.pdf?_tid=spdf-afb3a927-8231-4aa7-bb88-85321ae3feeb&acdnat=1519911643_a749a7cb42633fb4085505226c15546c)
117. Baldwin AS. THE NF- $\kappa$ B AND I $\kappa$ B PROTEINS: New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1996;14(1):649–81. Available from:

- <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.14.1.649>
118. Li XC, Zhuo JL. Nuclear factor- $\kappa$ B as a hormonal intracellular signaling molecule: Focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(1):37–43.
  119. Silverman N, Maniatis T. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*. 2001;15(18):2321–42.
  120. Li ZW, Chen H, Campbell RA, Bonavida B, Berenson JR. NF- $\kappa$ B in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(4):391–9.
  121. Siebenlist U. NF  $\kappa$  B r l k B proteins . Their role in cell growth , differentiation and. 1997;8:7–13.
  122. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev*. 2004;18(18):2195–224.
  123. Lenardo MJ, Fan CM, Maniatis T BD. The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. 1989;57:287–94.
  124. Coope HJ, Atkinson PGP, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, et al. CD40 regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 to p52. *EMBO J*. 2002;21(20):5375–85.
  125. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- $\kappa$ B2 in maturing B cells. *Nat Immunol*. 2002;3(10):958–65.
  126. Hsu H, Xiong J, Goeddel Dv. The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NF kappa B activation. *Cell*. 1995;8145(412):495–504.
  127. Shoji Y, Gilles C, Christine B, Alain I, Simon Tw, Robert W, et al. Complementation Cloning of NEMO, a Component of the I $\kappa$ B Kinase Complex Essential for NF- $\kappa$ B Activation. *Cell [Internet]*. 1998;93(7):1231–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740081466X?via%3Dihub>
  128. Zandi E, Rothwarf-D, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The i kappa b kinase complex (ikk) contains two kinase subunits, ikk alpha and ikk beta, necessary for i kappa b phosphorylation and nf kappa b activation. *Cell*. 1997;91(2):243–52.

129. Karin M, Ben-neriah Y. P HOSPHORYLATION M EETS U BIQUITINATION : The Control of NF- $\kappa$ B Activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;621–63.
130. Okamoto T. The epigenetic alteration of synovial cell gene expression in rheumatoid arthritis and the roles of nuclear factor  $\kappa$ B and Notch signaling pathways. *Mod Rheumatol.* 2005;15(2):79–86.
131. Bonizzi G, Karin M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280–8.
132. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, et al. The Lymphotoxin-b Receptor Induces Different Patterns of Gene Expression via Two NF- $\kappa$ B Pathways University of California San Diego. 2002;17:525–35.
133. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science (80- ).* 2001;293(5534):1495–9.
134. Kato T, Delhase M, Hoffmann A, Karin M. CK2 is a C-terminal I $\kappa$ B kinase responsible for NF- $\kappa$ B activation during the UV response. *Mol Cell.* 2003;12(4):829–39.
135. Lin R, Beauparlant P, Makris C, Meloche S, Hiscott J. Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol Cell Biol.* 2015;16(4):1401–9.
136. Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. NF- $\kappa$ B and cell-cycle regulation: The cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):73–90.
137. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF- $\kappa$ B activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene.* 2001;20(31):4188–97.
138. Marok R, Winyard PG, Coumbe A, Kus ML, Gaffney K, Blades S, et al. Activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 1996;39(4):583–91.
139. Romieu-Mourez R. Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of NF- $\kappa$ B in breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3810–8.
140. Gasparian A V, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF- $\kappa$ B transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci [Internet].* 2002;115(Pt 1):141–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801732>

141. Inflammation IKK $\alpha$ , Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li Z, et al. IKK $\alpha$  Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell*. 2004;118:285–96.
142. Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Ovarian cancer in endometriosis: Molecular biology, pathology, and clinical management. *Int J Clin Oncol*. 2009;14(5):383–91.
143. Covens A, Carey M, Bryson P, Verma S, Fung Kee Fung M, Johnston M. Systematic review of first-line chemotherapy for newly diagnosed postoperative patients with stage II, III, or IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2002;85(1):71–80.
144. Edmonds L. Current Diagnosis and Treatment: Pediatrics. *J Paediatr Child Health*. 2010;46(5):283–283.
145. Guo RX, Qiao YH, Zhou Y, Li LX, Shi HR, Chen KS. Increased staining for phosphorylated AKT and nuclear factor- $\kappa$ B p65 and their relationship with prognosis in epithelial ovarian cancer. *Pathol Int*. 2008;58(12):749–56.
146. Carty M, Bowie AG. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2010;161(3):397–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2962956/pdf/cei0161-0397.pdf>
147. Darb-Esfahani S, Sinn B V., Weichert W, Budczies J, Lehmann A, Noske A, et al. Expression of classical NF- $\kappa$ B pathway effectors in human ovarian carcinoma. *Histopathology*. 2010;56(6):727–39.
148. Guo LM, Pu Y, Han Z, Liu T, Li YX, Liu M, et al. MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF- $\kappa$ B1. *FEBS J*. 2009;276(19):5537–46.
149. Hernandez L, Hsu SC, Davidson B, Birrer MJ, Kohn EC, Annunziata CM. Activation of NF- $\kappa$ B signaling by inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase  $\beta$  increases aggressiveness of ovarian cancer. *Cancer Res*. 2010;70(10):4005–14.
150. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, et al. Inhibition of inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B phosphorylation increases the efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Clin Cancer Res*. 2004;10(22):7645–54.
151. Huang Y. I $\kappa$ B Kinase Activation Is Involved in Regulation of Paclitaxel-Induced Apoptosis in Human Tumor Cell Lines. *Mol Pharmacol*.

- 2002;61(1):105–13.
152. Xiao CW, Yan X, Li Y, Reddy SAG, Tsang BK. Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor  $\alpha$  is a consequence of nuclear factor  $\kappa$ B-mediated induction of Fas-associated death domain-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-like inhibitory protein. *Endocrinology*. 2003;144(2):623–30.
  153. Notes P. 534 Bba 71 020. *Most*. 1968;534–7.
  154. Maupin-furlow JA, Wilson HL, Kaczowka SJ, Ou MS. [Frontiers in Bioscience 5, d837-865, September 1, 2000] PROTEASOMES IN THE ARCHAEA: FROM STRUCTURE TO FUNCTION Julie A. Maupin-Furlow, Heather L. Wilson, Steven J. Kaczowka, and Mark S. Ou. *Perspective*. 2000;837–66.
  155. Hasselgren PO, Fischer JE. The ubiquitin-proteasome pathway: Review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions. *Ann Surg*. 1997;225(3):307–16.
  156. Peters JM. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci*. 1994;19(9):377–82.
  157. Jennissen HP. Ubiquitin and the Enigma of Intracellular Protein Degradation. *Eur J Biochem*. 1995;231(1):1–30.
  158. Lou JJW, Chua YL, Chew EH, Gao J, Bushell M, Hagen T. Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein Synthesis by DNA damage inducing agents. *PLoS One*. 2010;5(5).
  159. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1992;12(12):5447–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1448077><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC360482>
  160. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995;92(12):5510–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539918><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC41725>
  161. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J*



- Physiol Physiol. 2017;271(4):C1172–80.
162. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *J Biol Chem.* 2002;272(36):22642–7.
  163. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch. *Science (80- ).* 2002;295(5556):858–61.
  164. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997;11(1):72–82.
  165. Bárdos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2005;1755(2):107–20.
  166. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature.* 2001;414(6863):550–4.
  167. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: Involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* 1997;57(23):5328–35.
  168. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (80- ).* 2001;294(5545):1337–40.
  169. Epstein ACR, Gleadle JM, Mcneill LA, Hewitson KS, Rourke JO, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation The Henry Wellcome Building of Genomic Medicine. *Cell [Internet].* 2001;107(1):43–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595184>
  170. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. Redox-Regulated Recruitment of the Transcriptional Coactivators CREB-Binding Protein and SRC-1 to Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol.* 2009;20(1):402–15.
  171. Mcknight S, Schaffner W. *Biol. Chem.*, Vol. 378, p. 573, July 1997 · Copyright © by Walter de Gruyter & Co · Berlin · New York. 1997;378(July):11–2.
  172. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: A novel protein that interacts with

- HIF-1a and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001;15(20):2675–86.
173. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(3):336–61.
  174. Irigoyen M, García-Ruiz JC, Berra E. The hypoxia signalling pathway in haematological malignancies. *Oncotarget.* 2017;8(22):36832–44.
  175. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* (80- ). 2001;292(5516):468–72.
  176. Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48403–9.
  177. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14013–9.
  178. Ryan J H. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. 2013;17(11):3005–15.
  179. Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J Neurosci* [Internet]. 1999;19(16):6818–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436039>
  180. Haddad JJE, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1a and NF- $\kappa$ B redox sensitivity: Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21130–9.
  181. Jiwa LS, van Diest PJ, Hoefnagel LD, Wesseling J, Wesseling P, Moelans CB. Upregulation of Claudin-4, CAIX and GLUT-1 in distant breast cancer metastases. *BMC Cancer.* 2014;14(1):1–6.
  182. H. Z, A.M. DM, E. L, M. L, D.A. H, D. Z, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* [Internet]. 1999;59(22):5830–5. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L29561683%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00085472&id=doi:&atitle=Overexpression+of+hypoxia->

inducible+factor+1 $\alpha$ +in+common+human+cancers+and+their+metastases&st  
i

183. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  in Epithelial Ovarian Tumors. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2001;7(6):1661 LP – 1668. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/7/6/1661.abstract>
184. Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Wei A-Q, Robertson G, Morris DL. Vascular endothelial growth factor expression correlates with serum CA125 and represents a useful tool in prediction of refractoriness to platinum-based chemotherapy and ascites formation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015;6(29).
185. Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, Simos G, Minas M, Messinis IE, et al. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor 1 alpha(HIF-1alpha) expression in serous ovarian cancer: An immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 2008;8:1–10.
186. Maxwell PH, Wykoff CC, Chang G-W, Maher ER, Pugh CW, Vaux EC, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 2002;399(6733):271–5.
187. Dang C V. Oncogenic alterations of metabolism. *AACR Annu Meet* [Internet]. 2014;0004(98):Abstract #. Available from: <http://webcast.aacr.org/console/player/22401?mediaType=slideVideo&>
188. Nakai H, Watanabe Y, Ueda H, Hoshiai H. Hypoxia inducible factor 1- $\alpha$  expression as a factor predictive of efficacy of taxane/platinum chemotherapy in advanced primary epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2007;251(1):164–7.
189. Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Yoshida J, Hayashi A, Ota M, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ , and von Hippel-Lindau protein in epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is an independent prognosti. *Hum Pathol*. 2007;38(9):1310–20.
190. Jin Y, Wang H, Ma X, Liang X, Liu X, Wang Y. Clinicopathological characteristics of gynecological cancer associated with hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression: A meta-analysis including 6,612 subjects. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(5):1–23. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127229>

191. Dang DT, Chun SY, Burkitt K, Abe M, Chen S, Havre P, et al. Hypoxia-inducible factor-1 target genes as indicators of tumor vessel response to vascular endothelial growth factor inhibition. *Cancer Res.* 2008;68(6):1872–80.
192. AJ T, RE I, D C. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *BioEssays [Internet]*. 2001;23:261–9. Available from: <http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00004584>
193. Devault A, Lazure C, Nault C, Le Moual H, Seidah NG, Chrétien M, et al. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* 1987;6(5):1317–22.
194. Shipp MA, Masteller EL, Reinherz EL. Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): Multiple miniexons and separate 5' untranslated regions (leukemia/protease/alternative splicing/lymphoid differentiation). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(September 1989):7103–7.
195. Shipp MA, Vijayaraghavan J, Schmidt E V., Masteller EL, D'Adamio L, Hersh LB, et al. Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 (“enkephalinase”): direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;86(1):297–301.
196. 108 booze1995.pdf.
197. Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K. Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.* 1995;371(2):140–4.
198. SCHWEIZER A, VALDENAIRE O, NELBÖCK P, DEUSCHLE U, DUMAS MILNE EDWARDS J-B, STUMPF JG, et al. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J.* 1997;328(3):871–7.
199. Turner AJ, Brown CD, Carson JA, Barnes K. The Neprilysin Family in Health and Disease. *Cell Pept Immune Funct Dis* 2. 2006;229–40.
200. Shinji B. in *Human Cell.* 2015;74(4):1235–40.
201. SHIMIZU T, BERISHA B, SCHAMS D, MIYAMOTO A. Changes in the Messenger RNA Expressions of the Endothelin-1 and Angiotensin Systems

- in Mature Follicles of the Superovulated Bovine Ovary. *J Reprod Dev.* 2007;53(3):655–62.
202. Tedeschi C, Lohman C, Hazum E, Ittoop O, Ben-Shlomo I, Resnick CE, et al. Rat Ovarian Granulosa Cell as a Site of Endothelin Reception and Action: Attenuation of Gonadotropin-Stimulated Steroidogenesis via Perturbation of the A-Kinase Signaling Pathway<sup>1</sup>. *Biol Reprod.* 2005;51(5):1058–65.
203. Shea O. *Composition Cyclic.* 1988;(1984):1984–8.
204. Redmer DA, Grazul AT, Kirsch JD, Reynolds LP. Angiogenic activity of bovine corpora lutea at several stages of luteal development. *Reproduction.* 1988;82(2):627–34.
205. BAIRD DT, SCARAMUZZI RJ. Prostaglandin F<sub>2</sub>A and Luteal Regression in the Ewe : Comparison With 16 Aryloxyprostaglandin (I. C. I. 80, 996) . *Ann Biol Anim Biochim Biophys.* 1975;15(2):161–74.
206. Meidanl R, Milvae RA, Weiss S, Levy N, Friedman A. Intraovarian regulation of luteolysis. 1996;217–28.
207. Wang WE, Mamluk RON, Arditi F, Haemek B. Corpus Luteum : Elevation in the Bovine by Prostaglandin. *Society.* 1996;137(12):3–8.
208. Levy N, Gordin M, Mamluk R, Yanagisawa M, Smith MF, Hampton JIMH, et al. Distinct Cellular Localization and Regulation of Expression in the Bovine Corpus Luteum : Implications for Luteolysis. *Technology.* 2001;142(12):5254–60.
209. Ohtani M, Kobayashi S, Miyamoto A, Hayashi K, Fukui Y. Real-Time Relationships between Intraluteal and Plasma Concentrations of Endothelin, Oxytocin, and Progesterone during Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  ,-Induced Luteolysis in the Cow<sup>1</sup>. *Biol Reprod.* 2005;58(1):103–8.
210. Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A, Meidan R. Administration of Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  During the Early Bovine Luteal Phase Does Not Alter the Expression of ET-1 and of Its Type A Receptor: A Possible Cause for Corpus Luteum Refractoriness. *Biol Reprod.* 2005;63(2):377–82.
211. Shirasuna K, Watanabe S, Oki N, Wijayagunawardane MPB, Matsui M, Ohtani M, et al. A cooperative action of endothelin-1 with prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on luteal function in the cow. *Domest Anim Endocrinol.* 2006;31(2):186–96.
212. Milvae A, Antisteroidogenic I, Wang WE. Effect of Endothelin-1 Role in

- Prostaglandin. 2007;137(4):1306–12.
213. Milvae A, Antisteroidogenic I, Wang WE. Effect of Endothelin-1 Role in Prostaglandin. Society. 2007;137(4):1306–12.
214. Apa R, Miceli F, De Feo D, Pierro E, Ayala G, Mancuso S, et al. Endothelin-1: Expression and role in human corpus luteum. *Am J Reprod Immunol*. 1998;40(5):370–6.
215. Girsh E, Dekel N. Involvement of endothelin-1 and its receptors in PGF<sub>2</sub>α-induced luteolysis in the rat. *Mol Reprod Dev*. 2002;63(1):71–8.
216. Ko CM, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn YK, Su W, Gong MC, et al. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology*. 2006;147(4):1770–9.
217. Matsumoto T, Ozawa Y, Taguchi K, Kobayashi T, Kamata K. Diabetes-associated changes and role of Nε-(carboxymethyl)lysine in big ET-1-induced coronary vasoconstriction. *Peptides*. 2010;31(2):346–53.
218. Survey RE, Mb M. 137 134 137. 2011. p. 2011.
219. 135 sakurai1990.pdf.
220. Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, et al. Expression of endothelin 1 and endothelin a receptor in ovarian carcinoma: Evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*. 1999;59(3):720–7.
221. Meidan R, Levy N. Endothelin-1 receptors and biosynthesis in the corpus luteum: Molecular and physiological implications. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23(1–2):287–98.
222. Gentili M, Obermüller N, Schleich HG, Melchert F, Weigel M. Distinct expression of endothelin receptor subtypes A and B in luteinized human granulosa cells. *Horm Metab Res*. 2001;33(10):573–6.
223. Meidan R, Levy N. The ovarian endothelin network: an evolving story. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(10):379–85.
224. Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, et al. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1991;48(5):990–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2018043><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1683044>

225. Bagnato A, Tecce R, Castro V Di, Moretti C, Spergel D, Catt KJ. Autocrine Actions of Endothelin-1 as a Growth Factor in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res.* 1995;1(9):1059–66.
226. Bagnato A, Catt KJ. Endothelins as autocrine regulators of tumor cell growth. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;9(9):378–83.
227. Barki-Harrington L, Rockman HA.  $\beta$ -Arrestins: Multifunctional Cellular Mediators. *Physiology.* 2008;23(1):17–22.
228. Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. The importance of endothelin axis in initiation, progression, and therapy of ovarian cancer. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2010;299(2):R395–404.
229. Bagnato A, Tecce R, Di Castro V, Catt KJ. Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 1997;57(7):1306–11.
230. Spinella F, Rosanò L, Decandia S, Castro V Di, Albini A, Elia G, et al. Experimental Biology and Medicine Antitumor Effect of Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate in Ovarian Carcinoma Cells: Evidence for the Endothelin-1 as a Potential Target. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(6):1123–7.
231. Bagnato A, Spinella F. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(1):44–50.
232. Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Varmi M, Salani D, Rosanò L, et al. Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol Pharmacol [Internet].* 2002;61(3):524–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854432>
233. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27850–5.
234. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1-induced prostaglandin E3-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46700–5.
235. Spinella F, Rosanò L, Elia G, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 stimulates cyclooxygenase-2 expression in ovarian cancer cells through

- multiple signaling pathways: Evidence for involvement of transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44(SUPPL. 1):140–3.
236. Spinella F, Caprara V, Garrafa E, Di Castro V, Rosanò L, Natali PG, et al. Endothelin axis induces metalloproteinase activation and invasiveness in human lymphatic endothelial cells. This article is one of a selection of papers published in the two-part special issue entitled 20 Years of Endothelin Research. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2010;88(8):782–7. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/Y10-050>
237. Spinella F, Garrafa E, Castro V Di, Rosanò L, Nicotra MR, Caruso A, et al. Endothelin-1 stimulates lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels to grow and invade. *Cancer Res*. 2009;69(6):2669–76.
238. Salani D, Castro V Di, Nicotra MR, Rosanò L, Tecce R, Venuti A, et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1537–47.
239. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2007;31(2):277–83.
240. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* [Internet]. 2002;115(Pt 3):455–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861753>
241. Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: A cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):51–63.
242. Rosano L. Integrin-linked kinase functions as a downstream mediator of endothelin-1 to promote invasive behavior in ovarian carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(4):833–42.
243. Fanning JJ, Umhauer SJ, Ruch RJ. Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(5):999–1000.
244. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442–54.
245. Steel CM. Epithelial Cancer of the Ovary. *Bmj*. 2011;312(7025):258–258.



246. Pahl, H L Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49) 6853–6866.  
<http://doi.org/10.1038/sj.onc.1203239>. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853–66.
247. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B and Cancer. *Clin Oncol*. 2007;19(2):154–61.
248. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Br J Cancer*. 2004;90(3):573–7.
249. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1a promoter via a functional NFkB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(4):755–61.
250. Lorusso PM, Schnipper LE, Stewart DJ, Boerner SA, Steven D, Iii WEC, et al. *Clinical Cancer Research*. 2010;(5915).
251. Bagnato A, Spinella F, Rosanò L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(4):761–72.
252. Pedram A, Razandi M, Hu R, Levin ER. Factor Production and Endothelial Cell Proliferation and Invasion \*. 1997;272(27):17097–103.
253. AJ T, RE I, D C. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *BioEssays*. 2001;23:261–9.
254. Nanus DM. Of Peptides and Peptidases: The Role of Cell Surface Peptidases in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6307–9.
255. Hayden MSGS. Signaling to NF-kB. *Prog Biochem Biophys*. 1997;24(4):2195–224.
256. Masoud GN, Li W. HIF-1a pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B [Internet]*. 2015;5(5):378–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
257. Chen Y, Zhang L, Pan Y, Ren X, Hao Q. Over-expression of semaphorin4d, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor is related to poor prognosis in ovarian epithelial cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(10):13264–74.
258. Shimogai R, Kigawa J, Itamochi H, Iba T, Kanamori Y, Oishi T, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene affects the outcome in patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(3):499–505.

259. Birner P, Oberhuber G, Schindl M, Prodingler A, Budka H, Hainfellner JA, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in oligodendrogliomas: Its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer*. 2001;92(1):165–71.
260. Lee S, Garner EIO, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC. Over-expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007;106(2):311–7.
261. Huang L, Ao Q, Zhang Q, Yang X, Xing H, Li F, et al. Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancers via hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(3):447–56.
262. Liu L, Sun L, Zhang H, Li Z, Ning X, Shi Y, et al. Hypoxia-mediated up-regulation of MGr1-Ag/37LRP in gastric cancers occurs via hypoxia-inducible-factor 1-dependent mechanism and contributes to drug resistance. *Int J Cancer*. 2009;124(7):1707–15.
263. Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfander D, Wiedenmann B, Detjen K, et al. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  mediates anoikis resistance via suppression of  $\alpha$ 5 integrin. *Cancer Res*. 2008;68(24):10113–20.
264. Ai Z, Lu Y, Qiu S, Fan Z. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism. *Cancer Lett [Internet]*. 2016;373(1):36–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.009>
265. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Morita T, Ino K, Mizutani S, et al. Neutral endopeptidase 24.11/CD10 suppresses progressive potential in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2005;11(5):1798–808.
266. Chiarelli S, Buriticá C, Litta P, Ciani S, Guarch R, Nogales FF. An immunohistochemical study of morules in endometrioid lesions of the female genital tract: CD10 is a characteristic marker of morular metaplasia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(14 Pt 1):4251–6.
267. Kulkarni MM, Khandeparkar SGS, Joshi AR, Kothikar V, Nasare A, Patil S, et al. Role of CD10 immunoexpression in grading phyllodes tumour of the breast. *J Clin Diagnostic Res*. 2017;11(1):EC14–6.
268. Dai J, Shen R, Sumitomo M, Goldberg JS, Geng Y, Navarro D, et al. Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2001;7(5):1370–7.
269. Hersh LB, Steins H, Sundays ME, Reinherz EL. Peptides and Regulates the

- Growth of Small Cell Carcinomas of the Lung. 1991;88(December):10662–6.
270. Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, et al. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest*. 2000;106(11):1399–407.
271. CD10 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of normal endometrial stroma and of endometrial stromal neoplasms. *Histopathology*. 2001;39(3):273–8.
272. Potlog-Nahari C, Feldman AL, Stratton P, Koziol DE, Segars J, Merino MJ, et al. CD10 immunohistochemical staining enhances the histological detection of endometriosis. *Fertil Steril*. 2004;82(1):86–92.
273. Nascimento AF, Hirsch MS, Cviko A, Quade BJ, Nucci MR. The role of CD10 staining in distinguishing invasive endometrial adenocarcinoma from adenocarcinoma involving adenomyosis. *Mod Pathol*. 2003;16(1):22–7.
274. Ahmed ARH, Muhammad EMS. E-cadherin and CD10 expression in atypical hyperplastic and malignant endometrial lesions. *J Egypt Natl Canc Inst [Internet]*. 2014;26(4):211–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2014.08.002>
275. Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ*. 2008;15(10):1572–81.
276. Bagnato A, Spinella F, Rosanò L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy This article is one of a selection of papers published in the special issue (part 2 of 2) on *Frontiers in Endothelin*. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(8):473–84.
277. Vaiou M, Pangou E, Liakos P, Sakellaridis N, Vassilopoulos G, Dimas K, et al. Endothelin-1 (ET-1) induces resistance to bortezomib in human multiple myeloma cells via a pathway involving the ETB receptor and upregulation of proteasomal activity. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(10):2141–58.
278. Irani S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AKY. A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management. *Crit Rev Oncol Hematol [Internet]*. 2014;89(2):314–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.08.011>
279. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: Emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):110–6.

280. Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Castro V Di, Borsotti P, Giavazzi R, et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1703–11.
281. Spinella F, Rosanò L, Castro V Di, Natali PG, Bagnato A. Receptor, Angiogenesis, Ovarian Carcinoma 1. 2002;
282. Koong AC, Denko NO, Schindler C, Le QT, Terris DT, Ibrahim HZ, et al. 104 Candidate Genes for the Hypoxic Tumor Phenotype. *Int J Radiat Oncol.* 2004;45(3):201.
283. Grimshaw MJ, Naylor S, Balkwill FR. Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol Cancer Ther [Internet].* 2002;1(14):1273–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516960>
284. Udem C, Rios EJ, Maylor J, Shimoda LA. Endothelin-1 Augments Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Activity in Murine Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Rho Kinase. *PLoS One.* 2012;7(9):1–9.
285. Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(3):894–9.
286. Minchenko A, Caro J. Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: Role of hypoxia responsive element. *Mol Cell Biochem.* 2000;208(1–2):53–62.
287. ROSANÒ L, SALANI D, DI CASTRO V, SPINELLA F, NATALI PG, BAGNATO A. Endothelin-1 promotes proteolytic activity of ovarian carcinoma. *Clin Sci.* 2002;103(s2002):306S-309S.
288. Rosanò L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Lucidi A, et al. Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2350–60.

## The Role of NFκB HIF-1α and Neuropeptide (ET-1) - Peptidase (CD10 NEP) Axis in Ovarian Cancer: An Immunohistochemistry Approach

 Perdikouri E<sup>1</sup>, Liaskos C<sup>2\*</sup>, Papacharalampous K<sup>3</sup>, Nasi D<sup>1</sup>, Kostopoulou E<sup>3</sup>, Koukoulis G<sup>3</sup> and Papandreou C<sup>1</sup>
<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

<sup>2</sup>Department of Rheumatology and Clinical Immunology, University Hospital of Thessaly, Greece

<sup>3</sup>Pathology, Larissa Medical School, University of Thessaly, Greece

\*Corresponding author: Christos Liaskos, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Aristotle University of Thessaloniki, Greece, Tel: +30 2413502766; Fax: +30 2413501016; E-mail: liaskosch@med.uth.gr

Rec Date: March 09, 2019, Acc Date: May 15, 2019, Pub Date: May 20, 2019

Copyright: © 2019 Perdikouri E, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

**Introduction:** Ovarian cancer is considered to be the leading cause of death due to gynecological malignancies. Because of lack of effective screening methods, most patients are diagnosed at an advanced stage. Therefore, there is a mandatory need to develop new markers for early detection and prognostication as well as for response to treatment and detection of disease recurrence after definitive therapy.

**Aim:** Our study was designed to analyse immunohistochemically the expression of transcription factors NFκB and HIF-1α, in addition to biomarkers of endothelin axis (CD-10, ETAR and ETBR) in patients with ovarian cancer and relate their expression with overall survival and response to therapy.

**Methods:** Ninety four samples from paraffin-embedded tissues from patients with ovarian cancer were included. The final analysis of the samples compared two cohort groups that were dichotomized to positive and negative according to histoscore (either nucleoscore or cytoscore) of each patient.

**Results:** Patients expressing high NFκB nuclear score, high HIF-1α nuclear score, low CD-10 score and high ETAR and ETBR scores had worse overall survival. Moreover, platinum sensitive patients expressed lower nuclear NFκB, higher cytoplasmic HIF-1α, higher CD-10 and lower ETAR expression. NFκB cytoplasmic score and ETAR score were correlated with disease of early stage, while CD-10 histoscore was associated with advanced stages. More importantly, a combination of specific biomarkers was correlated with OS of patients.

**Conclusion:** Our study confirms the prognostic value of CD10 in ovarian carcinoma through its association with endothelin axis, while the last one (ET axis), mediated mainly through ETAR, may also have clinical and therapeutical impact. Finally, the nuclear expression of known transcriptional factors such as HIF-1α and NFκB could be prognostic biomarkers to assess clinical outcome and possibly predict resistance to platinum-based chemotherapy.

**Keywords:** Breast cancer; Immunohistochemical; Ovarian cancer; NFκB; HIF-1α

### Introduction

Ovarian cancer is the leading cause of gynecological cancer mortality worldwide. Approximately two thirds of the patients present with advanced stage disease (stage III or IV) at diagnosis [1]. As invasion and metastasis at the time of diagnosis significantly worsen the prognosis of survival of patients (<50% with a 5-year survival rate) [1], efforts to detect biomarkers that may be clinically relevant to cancer progression and response to current therapies are warranted.

One of the major transcription factors which has been investigated in various diseases including cancer is NF-κB (nuclear factor-kappa B). The central role of NF-κB expression in normal conditions is focused on the control of biochemical pathways promoting growth, apoptosis and differentiation. NF-κB seems to be activated in various types of cancers. In addition NF-κB can stimulate transcription of a big number

of regulating genes involving in angiogenesis, metastasis and other biological responses [2]. There is evidence that NF-κB is implicated in oncogenesis in many types of cancers [3] promoting cell survival, angiogenesis and metastasis leading to cancer progression and resistance to chemotherapy in various solid tumours [4].

In addition, oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of tumour progression and vascularization [5]. Hypoxia-inducible factors (HIF) are master regulators of the cellular response to hypoxia. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), a heterodimer composed of HIF-1α and HIF-1β subunits, is the major key molecule which can help the hypoxic cells to cope with hypoxia and plays a critical role in tumorigenesis, angiogenesis and apoptosis [6].

Endothelin (ET-1) and its receptors have also been implicated in cancer development and progression through both autocrine and paracrine pathway. ET-1 is produced mainly in endothelial cells and secondary in vascular cells and acts through two distinct subtypes of receptors, ETAR and ETBR [7]. Upon activation, the receptors mediate a variety of signalling involved in the control of cell proliferation,

survival, migration and invasion [8]. Regarding ovarian carcinoma, it has been demonstrated that expression of ET-1 is significantly increased in carcinomas compared to normal ovarian tissues [9]. ET-1 selectively acts mainly through the endothelin A receptor (ETAR), and is involved in cell proliferation, invasiveness, neovascularization and prevention of apoptosis, thus promoting carcinogenesis [10].

In addition, CD10 (also known as CALLA-common acute lymphoblastic leukemia antigen or NEP- neutral endopeptidase), a T-cell differentiation antigen has been reported to be involved in tumour progression in certain human malignancies including ovarian carcinoma. Specifically, neutral endopeptidase (NEP) is a cell surface peptidase with an ubiquitous expression involved in the catalytic degradation of a number of bioactive peptides including ET-1 [11].

NEP is involved in neoplastic transformation and tumor progression in certain human malignancies including lung, breast, prostate and ovarian carcinomas by inactivating ET-1 which is considered to be an autocrine growth factor for these tumors. As a result, loss or decrease in NEP expression allows the presence of its peptide substrates (including ET-1) on cell surface resulting in unopposed signalling through their cognate receptors and thus facilitating progression of neoplasia [12].

Until now, only few data exist in the literature on the impact of NF-κB, HIF-1α, CD10 and ETR expression on prognosis of ovarian cancer, whereas most data derive from in vitro studies in cancer cells cultures.

The aim of our study was to demonstrate in vivo, by using paraffin embedded tissue and an immunohistochemistry approach, if the expression of those markers has any prognostic or even predictive value in patients with ovarian cancer treated with platinum-based chemotherapy.

In the era of personalised medicine and targeted therapies, identification of target-drugable molecules could be of paramount importance in an effort to increase efficacy of the applied therapy while minimizing toxicity in large patient population. Because of our previous research experience in which we have shown that the NFκB/ETAR/NEP (CD10) pathway involved in prostate cancer, we sought to investigate the potential involvement of these interacting pathways in ovarian cancer, in order to define prognostic but more importantly predictive factors carrying the potential of drugability.

## Materials and Methods

A total of 94 consecutive patients diagnosed with ovarian cancer at the Department of Medical Oncology at the University Hospital of Larissa were included in the study. The median age of patients at the time of surgery was 52.3 ± 12.1 years. The histological types were as follows: serous (n=54, 57.4%), mucinous (n=9, 9.6%), endometrioid (n=9, 9.6%), clear cell carcinoma (n=2, 2.1%), mixed cell type (n=15, 16%) and other uncommon types (n=5, 5.3%). Tumors were classified and staged after surgery (if surgery was performed) as I, II, III and IV in 23 (24.5%), 7 (7.4%) 59 (62.8%) and 5 (5.3%) of the cases, respectively. Stage and grade were determined according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics standards. At the end of follow up period, 41/94 (43.6%) were deceased due to their disease.

Patients received postoperatively 6 cycles of paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> and carboplatin after calculating the area under the concentration curve (AUC:6) every 3 weeks. Among 94 patients, 17 (18.1%) developed resistance to platinum based chemotherapy, while the

remaining 77 (81.9%) were platinum-sensitive (defining as platinum sensitive the disease with progression or relapse at least 6 months after the end of adjuvant or 1st line platinum- based chemotherapy).

Response to chemotherapy was evaluated as follows: No evidence of disease was defined as the complete response of the disease for at least 4 weeks, (confirmed by physical examination, ultrasound or computed scan tomography), while progressive disease was defined as an increase of at least 25% in the size of the measurable lesion or the appearance of an unequivocal new lesion after beginning of chemotherapy. The clinical and demographic data of the patients summarized in Table 1.

	n=94	%
<b>Stage</b>		
I	23	24.5
II	7	7.4
III	59	62.8
IV	5	5.3
<b>Type</b>		
Serous	54	57.4
Mucinous	9	9.6
Endometrioid	9	9.6
Clear cell carcinoma	2	2.1
Mixed cell type	15	16
Uncommon types	5	5.3
Sensitive to platinum	77	81.9
Resistance to platinum	17	18.1
<b>Status</b>		
Dead	41	43.6
Alive	53	56.4

Table 1: Clinicopathological parameters of patients with Ovarian cancer included in the study.

## Immunohistochemical staining of ovarian tumour tissue (paraffin blocks)

Tissue samples of ovarian cancer which were previously fixed in 10% buffered formalin, processed and embedded in paraffin routinely and stored where used for our study. Sections were cut at 3 μm by using a Leica microtome TP1020 and dried overnight at 60°C.

In order to prepare sections for immunohistochemistry, after a first step of deparaffinization using xylene, the sections were rehydrated in decreasing ethanol solutions. After that, dilutions of 0.3% hydrogen peroxidase for 10 min were used to block endogenous peroxidase activity. Then, optimal antigen retrieval was achieved by microwaving tissue sections in 0.01 M citrate buffer solution (pH 6) for 20 min. Finally, sections cooled and washed in Tris Buffer Saline (TBST) for three times.

Tissue sections were incubated with each antibody at room temperature. Immunostaining procedure was performed with the antibodies that listed in Table 2. Immunostaining was performed in all patients (n=94) for NFκB, HIF-1a and CD-10 detection while for ETAR and ETBR detection was performed in only 70 samples. The incubation period was 30 min for NFκB, HIF-1a and CD-10, and 60 min for ETAR and ETBR. After the immunostaining, slides were washed in TBST and a sensitive detection fluid was added (a novel system of non-biotin polymeric technology containing 2 major components: Super Enhancer and a Poly-HRP reagent in order to eliminate problems associated with endogenous biotin) (Biogenex), followed by incubation for 50 min. The antibodies that were bound, were visualized by using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine solution (DAB solution, DAKO). Finally, the enzyme horseradish peroxidase (HRP) catalyzes the conversion of chromogenic substrates (e.g., DAB, AEC) into coloured products facilitating in this way tissue staining. At a final step, sections were counterstained with hematoxylin.

Antibody	Optimal dilution	Company
NFκB p65, clone F-6	1:500 for 30 min	Santa Cruz
HIF-1A, clone H1alpha	1:25 for 30 min	Novus
CD10, clone 56C6	1:30 for 30 min	Dako
ETAR, clone N-15	1:100 for 60 min	Santa Cruz
ETBR, clone A-20	1:100 for 60 min	Santa Cruz

Table 2: Antibodies used in this study.

All slides were reviewed blindly and independently by two pathologists. The median values of results were used for all further calculations. If differences of more than 30% between observers occurred, these slides were re-assessed by both investigators and a final consensus score was obtained for further statistical analysis.

Determination of NFκB/p65 and HIF-1a was performed in both cytoplasmic and nuclear compartment. ETAR and ETBR detection was membranous while CD10 immunostaining gave a diffuse cytoplasmic or membranous staining pattern.

Intensity of immunoreactivity for each immunostaining marker was graded as follows: 0 – none (no detectable immunostaining on tumor cells), 1=weak (weak staining in the majority of tumor cells), 2=moderate (medium staining intensity of tumor cells), and 3=strong (high staining intensity of tumor). The prevalence of neoplastic cells with cytoplasmic staining was approximately determined in the entire tumour area, while the percentage of nuclear staining was determined by counting positive tumour nuclei in 500 tumour cells. The overall immunohistochemical score (histoscore) was expressed as the percentage of positive tumour cells (100%) multiplied by their staining intensity (0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=strong). Therefore, the total histoscore for each marker ranged from 0 to 300.

### Statistical Analysis

All numerical values are expressed as mean ± SD or median according to their distribution (normally and non-normally respectively). Data were analyzed by t-test, χ<sup>2</sup> test (two-by-two with Yates' correction) and Fisher's exact test where applicable. Each p-value below 0.050 was considered statistically significant.

Overall survival (OS) was defined as the length of time from either the date of diagnosis or the date of surgery, that patients diagnosed with ovarian cancer are still alive, while disease-free survival (DFS) was defined as the period until the patient survives without any signs of reappearance of the disease (symptoms or new tomography findings). These two parameters were used to check the probability of survival using the Kaplan-Mayer method. All parameters that were significant by Kaplan-Mayer analysis (univariate analysis, p<0.050) were used in a multivariate Cox regression model in order to identify possible independent risk factors. Statistical analyses were performed using SPSS version 17.0 (IBM, Armonk, New York, USA).

### Results

Mean ± SD histoscore expression of each protein was as follow; NFκB cytoscore: 219.4 ± 63.9, NF-κB nucleoscore: 32.7 ± 46, HIF-1a cytoscore: 119.6 ± 81.5, HIF-1a nucleoscore: 108.9 ± 84.3, CD-10 score: 30.8 ± 58.2, ETAR score: 84.1 ± 112.1, ETBR score: 48.1 ± 70.3. The final results for analysis were performed after the patients were dichotomized in two parts based on histoscore of each marker (according to the median value of each marker). Overall immunohistochemical staining results are summarized in Table 3.

Histoscore	Sample (n=94)	%
NFκB cytoscore Mean ± SD	219.4 ± 63.9	-
SCORE <200/>200	39/55	41.5/58.5
NFκB nucleoscore Mean ± SD	32.7 ± 46	-
SCORE <25/>25	32/62	34/66
HIF-1a cytoscore Mean ± SD	119.6 ± 81.5	-
SCORE <75/>75	35/59	37.2/62.8
HIF-1a nucleoscore Mean ± SD	108.9 ± 84.3	-
SCORE <75/>75	31/63	33/67
CD-10 score Mean ± SD	30.8 ± 58.2	-
SCORE <25/>25	69/25	73.4/26/6
ETAR score Mean ± SD	84.1 ± 112.1	-
SCORE <75/>75	44/26	62.9/37.1
ETBR score Mean ± SD	48.1 ± 70.3	-
SCORE <75/>75	47/23	67.1/32.9

Table 3: NFκB and HIF-1a cytoplasmic and nuclear histoscore, CD-10, ETAR and ETBR histoscore value.

### Correlation between overall survival (OS) and histoscore of each biomarker

Despite using different cut-off points of histoscore for positivity, cytoscore of NFκB was not associated with any gain considering OS of patients. On the contrary, nuclear NFκB expression was inversely correlated with OS (low NFκB nucleoscore was associated with increased OS) regardless of stage. In particular, patients with NFκB nucleoscore less than 25 had an OS 113.5 ± 9.1 months compared to 88.1 ± 7.4 months of patients with nucleoscore >25, (p=0.048) (Figure 1).

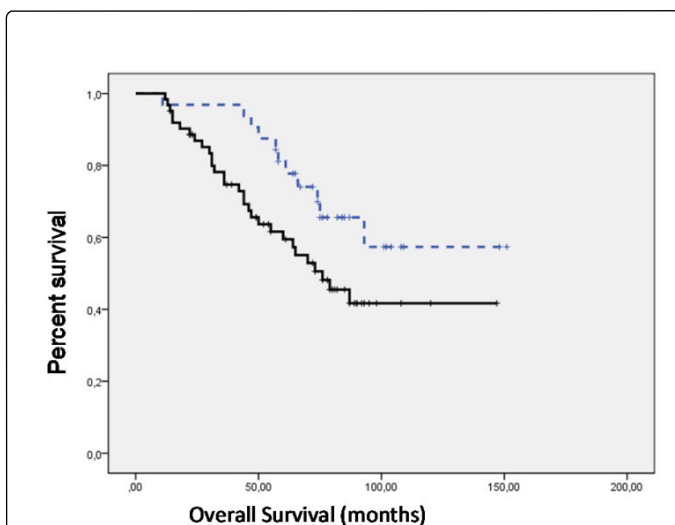


Figure 1: High NFκB nuclear expression correlates with a clinically aggressive tumor phenotype. The Kaplan-Meier survival curves show that patients with high histoscore (black solid-line) had a reduced overall survival compared to patients with low NFκB nucleoscore (blue dot-line) ( $88.1 \pm 7.4$  vs.  $113.5 \pm 9.1$  months,  $p=0.048$ ).

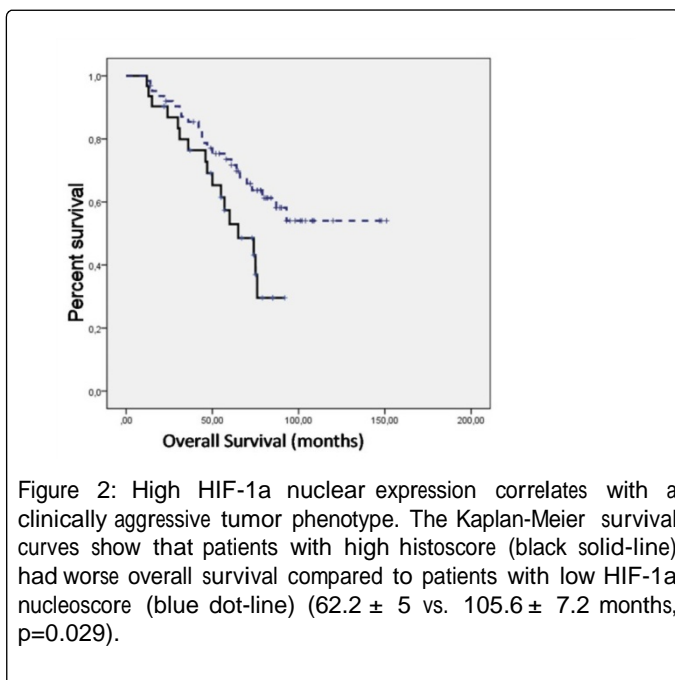


Figure 2: High HIF-1α nuclear expression correlates with a clinically aggressive tumor phenotype. The Kaplan-Meier survival curves show that patients with high histoscore (black solid-line) had worse overall survival compared to patients with low HIF-1α nucleoscore (blue dot-line) ( $62.2 \pm 5$  vs.  $105.6 \pm 7.2$  months,  $p=0.029$ ).

Cytoplasmic HIF-1α expression was also not associated with OS of patients in any comparison (using different cut-off points of histoscore for positivity), while nuclear expression was inversely associated with OS (low HIF-1α nucleoscore was associated with high overall survival). Specifically, patients with HIF-1α nucleoscore less than 75 had an OS  $105.6 \pm 7.2$  months compared to  $62.2 \pm 5$  months of patients with nucleoscore  $>75$  ( $p=0.029$ ) (Figure 2).

CD-10 expression was strongly correlated with OS (cut off value: 25 histoscore). Specifically, patients with low CD-10 expression

(histoscore $<25$ ) had a worse OS  $86.8 \pm 6.8$  compared to  $128.1 \pm 9$  months of patients with high CD-10 expression (histoscore $>25$ ) ( $p=0.011$ ) (Figure 3) regardless of the stage.

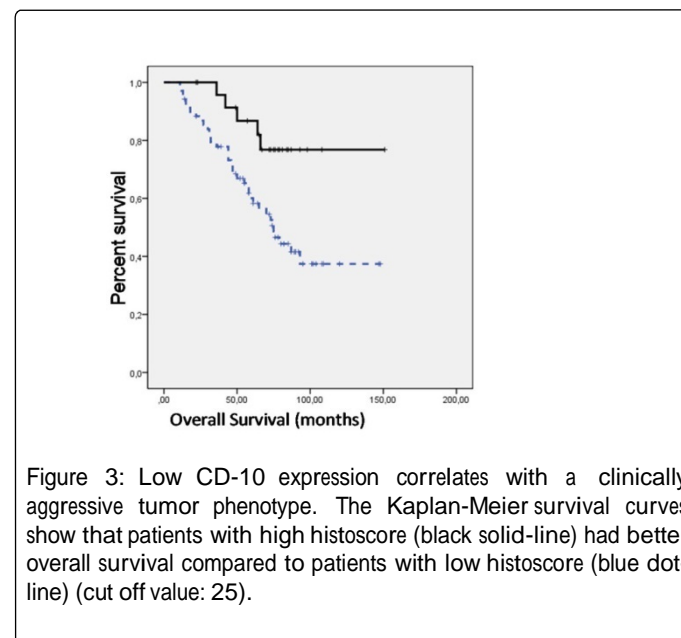


Figure 3: Low CD-10 expression correlates with a clinically aggressive tumor phenotype. The Kaplan-Meier survival curves show that patients with high histoscore (black solid-line) had better overall survival compared to patients with low histoscore (blue dot-line) (cut off value: 25).

Finally, ETAR expression was strongly correlated with OS. Patients with low ETAR histoscore had better OS than patients with high ETAR histoscore (cut off value: 75 histoscore)  $113.5 \pm 7.7$  vs.  $66.4 \pm 6.9$  months  $p=0.026$  (Figure 4).

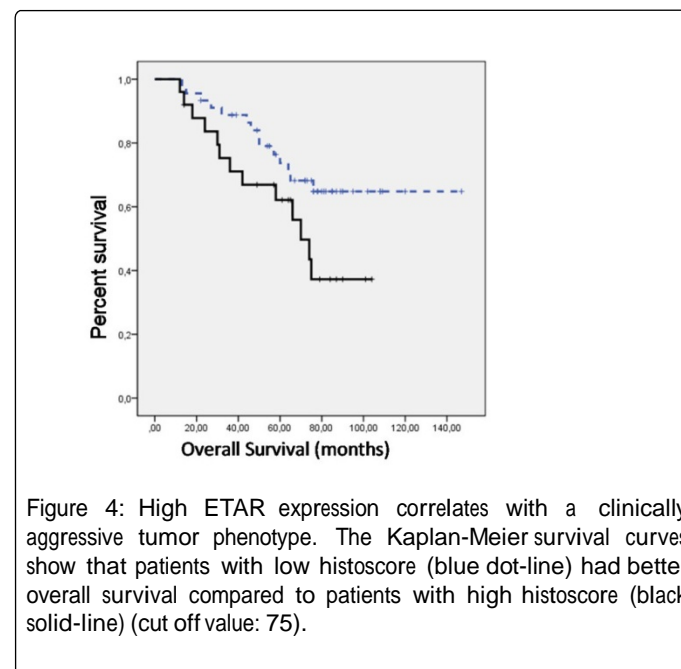


Figure 4: High ETAR expression correlates with a clinically aggressive tumor phenotype. The Kaplan-Meier survival curves show that patients with low histoscore (blue dot-line) had better overall survival compared to patients with high histoscore (black solid-line) (cut off value: 75).

On the contrary, ETBR expression was not associated with OS of patients with ovarian cancer. However, there was a trend for better OS for those patients with ETBR histoscore $<75$  vs. patients with histoscore  $>75$  ( $110.3 \pm 7.7$  vs.  $69 \pm 7.1$  months,  $p=0.076$ ) (Figure 5).



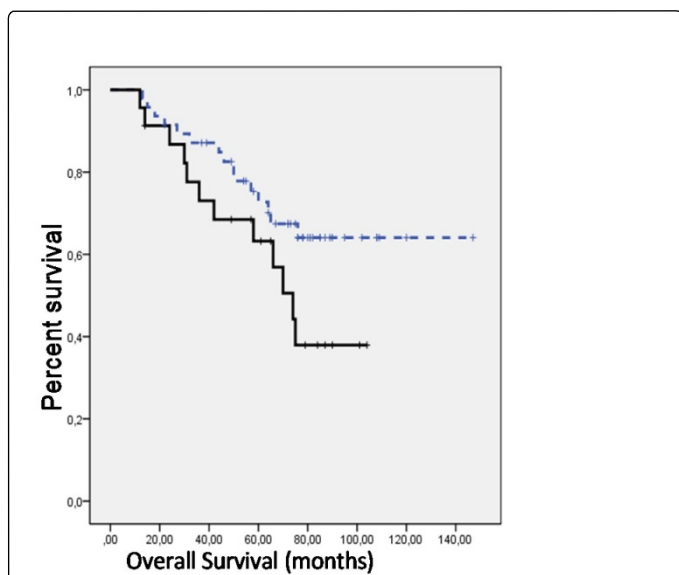


Figure 5: Expression of ETBR and OS. The Kaplan-Meier survival curves show that patients with high histoscore (black solid-line) had a trend to be associated statistically with reduced overall survival compared to patients with low score (blue dot-line) (110.3 ± 7.7 vs. 69 ± 7.1 months, p=0.076).

In conclusion, our statistical analysis shows that low NFκB, HIF-1α, ETAR and ETBR expression and high CD-10 expression (implying lower levels of ET-1) correlated with longer overall survival of patients with ovarian cancer.

#### Expression of biomarkers and correlation with platinum-based chemotherapy response

Histoscore	Chemotherapy Sensitivity		p value
	Resistant	Sensitive	
NFκB nucleoscore	<25	30	0.046
	>25	47	-
HIF-1α cytoscore	<75	25	0.042
	>75	52	-
CD-10 score	<25	52	0.004
	>25	25	-
ETAR score	<75	38	0.063
	>75	18	-

Table 4: Correlations between the histoscore of various biomarkers and response to chemotherapy.

Our research indicates that histoscores of various biomarkers was significantly correlated with chemotherapy responses. In general, platinum-sensitive patients had lower nuclear NFκB, higher cytoplasmic HIF-1α, higher CD-10 and lower ETAR expression (Table

4). Histoscores of cytoplasmic NFκB, nuclear HIF-1α and ETBR were not correlated with response to chemotherapy (data not shown).

#### Correlation between histoscore and stage of disease

NFκB cytoscore (<100 vs. >100) was positively correlated with early stage of disease (I vs II-IV, p=0.058). Furthermore, high CD-10 histoscore (<50 vs. >50) was associated with advance stage of disease (I vs. II-IV, p=0.045). In addition, lower ETAR histoscore (<100 vs. >100) was more often found in early stage (I vs. II-IV, p=0.042). All other comparisons between histoscore and stage of the disease did not reveal any significant correlation.

#### Multivariate analysis

For the multivariate analysis Cox proportional hazards model was used. NF-κB, HIF-1α, CD-10 and ETAR expression, stage of the disease and platinum sensitivity were entered into Cox regression. For all tests, p<0.05 was considered as significant. In multivariate analysis, strong HIF-1α and ETAR expression remained independent prognostic factors (p<0.0001), as well as tumour stage and platinum resistance. NF-κB, ETAR expression and stage had the biggest effect on the OS (Higher Hazard ratio-relative risk) (Table 5).

	Univariate analysis	Multivariate analysis		
	p	p	Hazard Ratio	95% CI
NF-κB	0.048	<b>0.003</b>	<b>5.608</b>	1.83-17.19
HIF-1α	0.029	0.077	0.403	0.14-1.10
CD10	0.011	0.787	1.119	0.357-3.89
ETAR	0.026	<b>0.006</b>	<b>3.975</b>	1.47-10.72
STAGE	0.012	<b>0.014</b>	<b>3.607</b>	1.29-10.08
Platinum-Resistance	<0.001	<b>&lt;0.001</b>	<b>9.055</b>	2.097-18.199
Serous Type	0.049	0.054	<b>2.78</b>	0.98-7.90

Strong NFκB and ETAR expression as well as tumor stage and resistance to chemotherapy remained independent prognostic factors.

Table 5: Multivariate cox regression analysis.

#### Interaction of biomarkers with OS

Given the impact of the above studied biomarkers on OS, we decided to study the interaction of some of these biomarkers with overall survival. Specifically, patients with high NFκB and HIF-1α histoscores (both with nucleus pattern) (n=23) had worse OS compared to those with low histoscores (n=22, p=0.003). Patients with low CD10 and high ETAR expression (n=18) had worse OS compared to those with high CD10 and low ETAR expression (n=41, p=0.022). In addition, patients with high HIF-1α and low CD10 expression (n=24) had also worse OS compared to those with low HIF-1α and high CD10 expression (n=18, p=0.002). Finally, patients with a histoprofile of NFκB high/HIF-1α high/CD10 low/ETAR high (n=9) gave the worst overall survival (30.3 months). The results are summarized in Table 6.

	Mean			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD10 low/ETAR high	59,881	8,372	43,471	76,290
CD10 high/ETAR low	1,13,916	7,933	98,368	1,29,465
NFκB low/HIF-1a low	1,17,995	10,424	97,565	1,38,426
NFκB high/HIF-1a high	55,945	6,358	43,483	68,406
HIF-1a low/CD10 high	1,20,131	11,568	97,458	1,42,803
NFκB high /CD10 low	81,189	8,111	65,291	97,088
NFκB low/CD10 high	1,33,926	10,954	1,12,454	1,55,395
HIF-1a high/CD10 low	54,511	5,295	44,134	64,889
NFκB low/HIF-1a low/CD10 high/ETAR low	1,39,345	11,453	1,00,234	1,62,458
NFκB high/HIF-1a high/CD10 low/ETAR high	30,32	4,23	22.67	39.45

Table 6: Interaction of biomarkers with OS.

## Discussion

Although, factors with traditionally prognostic significance have been mainly derived from the clinical and pathological staging, it has been suggested that the knowledge of molecular behavior of a tumor may represent a fundamental step to identify high-risk categories of patients and predict clinical outcome. According to this assumption, in recent years, targeted agents have become an integral part of treatment in an effort to inhibit specific cancer pathways. In this study we investigated the expression pattern of NF-κB, HIF-1a, CD-10, ETAR and ETBR in ovarian carcinomas.

To begin with, the results of our study demonstrate that a significant proportion of patients with ovarian cancer had detectable nuclear NF-κB expression which was correlated with more aggressive disease (due to association with worse OS and PFS). We studied both cytoplasmic and nuclear expression of NF-κB. When NF-κB is located in the cytoplasm it is considered to be in resting state, whereas when it translocates to the nucleus, following TLR (toll like receptor)-mediated signaling, it is considered to be activated [13]. NF-κB possesses a role in the regulation of the expression of targeted genes involved in normal procedures such as immune response, cell growth and survival [13]. According to this observation, the detection of cytoplasmic expression of NF-κB has minor importance since it represents the inactive form of this anti-apoptotic transcription factor, while the nuclear expression represents the activated state of this factor, reflecting to worse OS. Our finding is in agreement with previous studies, the majority of which assert that patients with a nuclear NF-κB expressing cancer have a shorter overall survival.

In addition, our study also demonstrates that the expression of HIF-1a in our cohort was associated with poor prognosis and also with resistance to chemotherapy. It is well established that hypoxia (low O<sub>2</sub> levels) is common aspect in carcinogenesis and many types of hypoxic tumor cells activate several survival pathways to carry out their essential biological processes. Recent studies highlighted the HIF-1a pathway as a crucial pathway for which novel strategies of therapy

could be developed [14]. Although the results of various studies are conflicting, the more prevalent belief is that HIF-1a nuclear expression is associated with poor prognosis and worse survival of patients with ovarian cancer, in agreement with our results [15-18]. In a previous study the authors found that ovarian clear cell carcinoma had the highest HIF-1a expression compared to other histological types [19] while other studies failed to see any correlation to histological type [17]. Furthermore, in accordance with our results, studies show that HIF-1a is overexpressed in the majority of hypoxic metastatic tumors and its expression is associated with chemoresistance [17,18,20-22]. In cell lines, expression of HIF-1a reduced cisplatin-induced apoptosis in sensitive cells whereas genetic knockdown of HIF-1a enhanced response to cisplatin in both cisplatin sensitive and resistant ovarian cancer cells [23].

We also showed that CD-10 expression in patients with ovarian cancer is a good marker of prognosis and sensitivity to chemotherapy. High expression of CD-10 was correlated with better OS and DFS in patients and also with good response to chemotherapy. In addition, CD10 expression decreased significantly in high grade tumors in ovarian and other types of cancer [24-26]. All these findings imply that high CD-10 expression can reduce progression of disease [24] and prolong survival through chemotherapy. The precise role of CD-10 in cancer evolution is controversial. Some studies report CD10 as tumor suppressor molecule in certain tumors included ovarian carcinoma [27]. In addition, reports have shown that CD10 plays a key role in the neoplastic progression through degradation or re-modulation of specific substrates including endothelin-1 and growth factors in various types of cancer [28-30].

Our findings are in agreement with previous studies. CD10 seems to be used as a sensitive marker to identify normal and atypical endometrial stromal cells [31]. Others studies reported that most of myoinvasive endometrial carcinomas expressed CD10 and this marker can distinguish atypical polypoid adenomyomas from endometrial carcinomas [32-34]. In ovarian carcinoma CD10 was expressed in both tumor cells and stromal cells although the intensity of the staining

varied among tissues. In another study CD10 expression was lower in patients with ovarian cancer with high grade tumors, similar to our results [35]. We also found that CD10 expression is correlated with good response to chemotherapy, in agreement with other studies where the expression of CD10 enhanced susceptibility to paclitaxel, [24,31] perhaps through the inhibition of FAK phosphorylation necessary procedure for the cell migration through formation of microtubular skeleton [36,37]. This study also showed that there was a significant decrease of cell proliferation and invasiveness in CD10-transfected ovarian carcinoma cells and so the overexpression of CD10 in vivo can reduce tumorigenesis in ovarian cancer cell lines [24]. Whether CD10 is more than just a marker of prognosis of OS and response to therapy or could be used as a potential target of therapy in patients with ovarian cancer requires further studies.

Furthermore, our study has shown that expression of ETAR but not ETBR portends a worse prognosis and response to therapy in patients with ovarian cancer since high expression of ETAR correlated with worse OS, resistance to chemotherapy and presence of more advanced stage of the disease. Recent studies suggested that activation of receptor A of endothelin-1 can promote tumorigenesis and tumor progression by various mechanisms, mainly angiogenesis but also proliferation, invasion and inhibition of apoptosis, stromal reaction, epithelial mesenchymal transitions, metastases and drug resistance [38-41].

All ET-induced tumor effects in ovarian carcinoma selectively occur via ETAR receptors while overexpression of ETBR is not a unique finding and could be found only in melanoma, glioblastoma, multiple myeloma [39] and rarely in colon and breast cancer [38]. Thus, the above indicate that the expression of the receptor involved in the effect of ET-1 strictly depends on the cell type. Under this observation, our findings that expression of ETBR was lower than ETAR and was not correlated with survival or response to therapy in patients with ovarian cancers were in accordance with previous observations. Our data referring to ETAR are consistent with findings in ovarian cancers in which expression of endothelin and ETAR are significantly associated with neo-vascularization and VEGF expression [42-44]. This expression of VEGF in turn stimulates growth and angiogenesis by increasing the levels of HIF-1α in a dose dependent manner [44]. In addition, hypoxia can induce endothelin transcription in several tumor cell types [45,46]. There is also a functioning Hypoxia Response Element in the antisense strand of the promoter of ET-1 [47,48] and induction of endothelin expression by hypoxia is probably via HIF-1 [49]. A previous study also demonstrated that endothelin is present at high concentration in ascites in patients with ovarian cancer indicate that this molecule could participate in the progression and invasion of ovarian carcinoma [50]. All these data clearly demonstrate that expression of ETAR is associated with worse survival and rapid tumor progression.

We have also demonstrated that patients with high expression of ETAR had platinum resistance. This finding is in accordance with previous studies [51]. In one of those studies when authors targeted ETAR with antagonist (zibotentan) in combination to chemotherapy, they noticed that could sensitize tumor to classical chemotherapeutics [51]. This probably works by preventing EMT (epithelial-mesenchymal transition)-associated escape signaling [51]. In ovarian cancer specific ETAR antagonists inhibit in vitro cell proliferation and the ET-mediated cytoprotection against paclitaxel [38].

## Conclusion

Our study was designed in order to investigate the possible role of CD-10/ endothelin axis as well as NFκB and HIF1α pathways in patients with ovarian cancer and to define if the expression of those biomarkers could be used as predictor factor of survival and resistance to chemotherapy. Actually, patients with ovarian cancer showed a markedly different expression map of biomarkers on tissue and these differences influence overall survival and thus can be used as prognostic markers. This current study demonstrates in vivo, according to real clinical data and long follow up, a possible prognostic and at the same time functional role of CD10 in ovarian carcinoma through its association with endothelin axis (ET-1/ETAR axis). Finally, the nuclear expression of known transcriptional factors such as HIF-1α and NFκB is demonstrated to be a potential prognostic biomarker associated with clinical outcome as well as a potential predictive one to platinum-based chemotherapy. Targeting the HIF-1α and NFκB pathway has been a promising progress in recent years.

It is obvious that our results need to be verified in larger and prospective studies, whereas the ways in which these three biochemical pathways (CD10/endothelin, HIF-1α and NFκB) are involved and affect each other should also be identified. If these results are confirmed, we could design studies testing drugs targeting the aforementioned pathways (taking into consideration the availability of ETAR antagonists or multiple agents targeting the antiangiogenic pathway to which HIF1α leads through the VEGF/ RAS/RAF/MAPK or VEGF/ PI3K/Akt pathways), especially in tumors with more aggressive biology, in the era of personal targeted medicine so as to enhance the therapeutic result.

## Ethics Approval and Consent to Participate

The study was conducted after approval from ethical review board of University of Thessaly.

## Availability of Data and Material

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request competing interests: "The authors declare that they have no competing interests"

## Funding

Financial and material support were obtained from University of Thessaly

## Authors' Contributions

C.P. conceived of the study, participated in its design and coordination, contributed to the acquisition, analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. E.I.P. had the major contributor in writing the manuscript. C.L had the major contributor in writing the manuscript and performed the statistical analysis. D.N. helped with data interpretation. K.P and E.K. performed the histological examination. G.K participated in its design and coordination, contributed to the acquisition, analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Cannistra SA (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 351: 2519-2529.
2. Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853.
3. Escarcega RO, Fuentes-Alexandro S, Garcia-Carrasco M, Gatica A, Zamora A (2007) The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol* 19: 154-161.
4. Baldwin AS (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. *J Clin Invest* 107: 241-246.
5. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, et al. (2007) Reactive oxygen species activate the HIF-1α promoter via a functional NFκB site. *Arter Thromb Vasc Biol* 27: 755-761.
6. Lu X, Kang Y (2010) Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res* 16: 5928-5935.
7. Rubanyi GM (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46: 325-3415.
8. Bagnato A, Tecce R, Di Castro V, Catt KJ (1997) Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 57: 1306-1311.
9. Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER (1997) Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 272: 17097-17103.
10. Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23: 261-269.
11. Nanus DM (2003) Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clin Cancer Res* 9: 6307-6309.
12. Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-κappaB. *Genes Dev* 18: 2195-2224.
13. Masoud GN, Li W (2015) HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 5: 378-389.
14. Chen Y, Zhang L, Pan Y, Ren X, Hao Q (2012) Over-expression of semaphorin4D, hypoxia-inducible factor-1α and vascular endothelial growth factor is related to poor prognosis in ovarian epithelial cancer. *J Mol Sci* 13: 13264-13274.
15. Shimogai R, Kigawa J, Itamochi H, Iba T, Kanamori Y, et al. (2008) Expression of hypoxia-inducible factor 1α gene affects the outcome in patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 18: 499-505.
16. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G (2001) Expression of hypoxia-inducible factor 1α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7: 1661-1668.
17. Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, Simos G, Minas M, et al. (2008) Prognostic significance of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1α) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 8: 335.
18. Lee S, Garner EI, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC (2007) Over-expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 106: 311-317.
19. Huang L, Ao Q, Zhang Q, Yang X, Xing H, et al. (2010) Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancers via hypoxia-inducible factor 1α. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 447-456.
20. Liu L, Sun L, Zhang H, Li Z, Ning X, et al. (2009) Hypoxia—mediated up—regulation of MGr1—Ag/37LRP in gastric cancers occurs via hypoxia—inducible—factor 1—dependent mechanism and contributes to drug resistance. *Int J Cancer* 124: 1707-1715.
21. Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfander D, Wedenmann B, et al. (2008) Hypoxia-inducible factor 1α mediates anoikis resistance via suppression of α5 integrin. *Cancer Res* 68: 10113-10120.
22. Ai Z, Lu Y, Qiu S, Fan Z (2016) Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism. *Cancer Lett* 373: 36-44.
23. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Morita T, Ino K, et al. (2005) Neutral endopeptidase 24.11/CD10 suppresses progressive potential in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 11: 1798-1808.
24. Chiarelli S, Buriticá C, Litta P, Ciani S, Guarch R, et al. (2006) An immunohistochemical study of morules in endometrioid lesions of the female genital tract: CD10 is a characteristic marker of morular metaplasia. *Clin Cancer Res* 12: 4251-4256.
25. Kulkarni MM, Khandeparkar SG, Joshi AR, Kothikar V, Nasare A, et al. (2017) Role of CD10 immunoeexpression in grading phyllodes tumour of the Breast. *J Clin Diagn Res* 11: EC14-EC16.
26. Khin EE, Kikkawa F, Ino K, Suzuki T, Shibata K, et al. (2003) Neutral endopeptidase/CD10 expression in the stroma of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 22: 175-180.
27. Dai J, Shen R, Sumitomo M, Goldberg JS, Geng Y, et al. (2001) Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 7: 1370-1377.
28. Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, et al. (1991) CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci* 88: 10662-10666.
29. Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, et al. (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 4: 50-57.
30. McCluggage WG, Sumathi VP, Maxwell P (2001) CD10 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of normal endometrial stroma and of endometrial stromal neoplasms. *Histopathology* 39: 273-278.
31. Ohishi Y, Kaku T, Kobayashi H, Aishima S, Umekita Y, et al. (2008) CD10 immunostaining distinguishes atypical polypoid adenomyofibroma (atypical polypoid adenomyoma) from endometrial carcinoma invading the myometrium. *Hum Pathol* 39: 1446-1453.
32. Srodon M, Klein WM, Kurman RJ (2003) CD10 immunostaining does not distinguish endometrial carcinoma invading myometrium from carcinoma involving adenomyosis. *Am J Surg Pathol* 27: 786-789.
33. Nascimento AF, Hirsch MS, Cviko A, Quade BJ, Nucci MR (2003) The role of CD10 staining in distinguishing invasive endometrial adenocarcinoma from adenocarcinoma involving adenomyosis. *Mod Pathol* 16: 22.
34. Ahmed AR, Muhammad EM (2014) E-cadherin and CD10 expression in atypical hyperplastic and malignant endometrial lesions. *J Egypt Natl Canc Inst* 26: 211-217.
35. Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, et al. (2000) Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 106: 1399-1407.
36. Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC (2008) Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ* 15: 1572-1581.
37. Bagnato A, Spinella F, Rosano L (2008) The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 473-484.
38. Vaiou M, Pangou E, Liakos P, Sakellaris N, Vassilopoulos G, et al. (2016) Endothelin-1 (ET-1) induces resistance to bortezomib in human multiple myeloma cells via a pathway involving the ETB receptor and upregulation of proteasomal activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 2141-2158.
39. Irani S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK (2014) A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management. *Crit Rev Oncol Hematol* 89: 314-321.
40. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 110-116.
41. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, et al. (2000) Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 157: 1537-1547.

42. Salani D, Taraboletti G, Rosano L, Di Castro V, Borsotti P, et al. (2000) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 157: 1703-1711.
43. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A (2002) Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1α in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 277: 27850-27855.
44. Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, et al. (2000) Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 60: 883-887.
45. Grimshaw MJ, Naylor S, Balkwill FR (2002) Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells supported, in part, by Oxford BioMedica United Kingdom Ltd.(to MJG). *Mol Cancer Ther* 1: 1273-1281.
46. Aversa CR, Oparil S, Caro J, Li H, Sun SD, et al. (1997) Hypoxia stimulates human preproendothelin-1 promoter activity in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273: L848-L855.
47. Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA (1998) Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 894-899.
48. Minchenko A, Caro J (2000) Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element. *Mol Cell Biochem* 208: 53-62.
49. Rosanò L, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, et al. (2002) Endothelin-1 promotes proteolytic activity of ovarian carcinoma. *Clin Sci* 48: 306S-309S.
50. Rosanò L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, et al. (2011) Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 17: 2350-2360.