



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανοσοϊστοχημική μελέτη έκφρασης
των υπεροξειδασών γλουταθειόνης 1 & 3 (GPX1 και GPX3)
στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού.**

Όνοματεπώνυμο Συγγραφέα: Χρυσάνθη Α. Μάρκου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μαρία Ιωάννου, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Επιβλέπουσα
- Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού
Διπλώματος Ειδίκευσης στην Παθολογική Ανατομική.

Λάρισα, Μάρτιος, 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Immunohistochemical study of expression
glutathione peroxidases 1 & 3 (GPX1 and GPX3)
in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC).**

By

Chrysanthi A. Markou

Advisory committee:

Maria Ioannou, Professor of Pathology, [Supervisor]

George Koukoulis, Professor of Pathology

Matthaios Speletas, Professor of Medical Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly
in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pathology.

Larissa , March, 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί αν δεν υπήρχε η άριστη συνεργασία στο χώρο του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Γι' αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον καθένα προσωπικά για το γνωστικό υπόβαθρο το οποίο μου μεταλαμπάδευσε.

Θα ήθελα θερμά να ευχαριστήσω πρώτα από όλους, τον κ. Κουκούλη Γεώργιο Διευθυντή και Καθηγητή του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου για την ευκαιρία που μου προσέφερε με σκοπό την υλοποίηση των στόχων μου καθώς και το ότι μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό και τα υλικά του εργαστηρίου του.

Επίσης την κα. Ιωάννου Μαρία Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, για την υπομονή της και το χρόνο που διέθεσε στην πραγματοποίηση της εργασίας. Καθώς η καθοδήγηση της, καθ' όλη αυτή την περίοδο υπήρξε πολύτιμη και ουσιαστική, με τη συμβουλή και την ενθάρρυνση της προς εμένα. Της είμαι ευγνώμων!

Επιπρόσθετα, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την κα Σαμαρά Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, για την υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου και διδάσκοντάς με τις τεχνικές του εργαστηρίου με τρόπο κατανοητό, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε και την προσπάθεια της να με κάνει καλύτερη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Λιάκου Ζωή, Βιοχημικό του εργαστηρίου για την υπομονή της και την υποστήριξη που μου προσέφερε εξηγώντας μου την ανοσοϊστοχημεία για το πειραματικό μέρος της εργασίας και όλοι την λειτουργία του εργαστηρίου.

Καθώς και τις κυρίες Λιακούλη Βασιλική και τη Μαγκιώση Χριστίνα Παρασκευάστριες, που μου έμαθαν τη χρήση του μικροτόμου και της χρώσης A-E και γενικότερα τη λειτουργία του παρασκευαστηρίου. Επίσης και την κα Νέτσικα Μαρία που μου επέτρεψε τη χρήση του αρχείου για τη συλλογή των δειγμάτων και των ιστολογικών εκθέσεων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω της υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου κυρίες Παπαθανασίου Μαρία, Βιολόγο και Χατζούλη Αικατερίνη, Ιατροδικαστή και την Αναγνώστου Μαρία Βιοχημικό, για την ψυχική μου ενδυνάμωση και την ενσυναίσθηση τους σε όλο αυτή την διαδικασία.

Με το μεγαλύτερο ευχαριστώ βέβαια να ανήκει στη μητέρα μου που είναι πάντα δίπλα μου και στηρίζει όλες μου τις αποφάσεις και τις προσπάθειες.

Τέλος, η ευχή που έχω να δώσω σε αυτούς τους ανθρώπου είναι ότι η συμπεριφορά που είχαν απέναντι μου, ας μεταφερθεί από τους άλλους ανθρώπους, προς αυτούς και τους αγαπημένους τους!!!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Περίληψη	6
Abstract.....	7
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.1 Εισαγωγή	8
1.2 Το διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (ΔΝΚΚ).....	9
1.3 Αιτιολογία – Παράγοντες κινδύνου ΔΝΚΚ	9
1.4 Κλινική εικόνα ΔΝΚΚ	12
1.5 Παθολογική- Ανατομική ΔΝΚΚ	13
1.5.1 Μακροσκοπική εικόνα	13
1.5.2 Μικροσκοπικοί χαρακτήρες	14
1.6 Προγνωστικοί παράγοντες στο ΔΝΚΚ	14
1.6.1 Σταδιοποίηση TNM.....	14
1.6.2 Ιστολογικός Βαθμός Διαφοροποίησης (Histologic grading).....	17
1.7 Μοριακές και κυτταρογενετικές Αλλοιώσεις στο ΔΝΚΚ.....	19
1.8 Κύρια Σηματοδοτικά Μονοπάτια στο Δ-ΝΚΚ.....	22
1.8.1 Μονοπάτι PI3K/AKT/Mtor	23
1.9 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – ROS – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	24
1.9.1 Οξειδωτικό στρες	24
1.9.2 ROS (Reactive Oxygen Species).....	26
1.9.3 Αντιοξειδωτικά.....	29
1.10 ΣΕΛΗΝΙΟ – ΣΕΛΗΝΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	32
1.11 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	36
1.11.1 GPX1	37
1.11.2 GPX2	39
1.11.3 GPX3	39
1.11.4 GPX4	40
1.11.5 GPX5	41
1.11.6 GPX6.....	41
1.11.7 GPX7	41
1.11.8 GPX8	42
1.12 Υπεροξειδάσες γλουταθειόνης 1 και 3 σε επιθηλιακά νεοπλάσματα	42
1.12.1 GPX1 σε επιθηλιακά νεοπλάσματα.....	42
1.12.2 GPX3 σε επιθηλιακά νεοπλάσματα.....	43

II ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1 Ασθενείς και Μέθοδοι	46
2.2 Ανοσοϊστοχημεία.....	46
2.3 Αξιολόγηση της Ανοσοϊστοχημείας.....	47
2.4 Στατιστική Ανάλυση.....	48
III ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασία κλινικοπαθολογοανατομικών Χαρακτηριστικών	
	48
3.2 Φωτογραφική Απεικόνιση της έκφρασης των GPX1 και GPX3	
	52
3.2.1 Έκφραση της GPX1	
	52
3.2.2 Έκφραση της GPX3	
	54
3.3 Στατιστική επεξεργασία της έκφρασης των GPX1 και GPX3	
	56
3.3.1 Στατιστική επεξεργασίας για την GPX1	
	57
3.3.2 Στατιστική επεξεργασία για την GPX3	
	59
IV ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	
	62
V ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα είναι η πιο κοινή μορφή κακοήθειας του νεφρού, προσβάλλοντας 1,5 με 2 φορές πιο συχνά τους άνδρες. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 64 έτη στις σποραδικές μορφές, και πολύ μικρότερη στην κληρονομική μορφή. Παρατηρείται γεωγραφική διακύμανση της νόσου, ενώ παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία, το φύλο, ο τρόπος ζωής, η συννοσηρότητα καθώς επίσης περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες. Συχνότεροι παράγοντες κινδύνου είναι το κάπνισμα, η υπέρταση και η παχυσαρκία. Η τελική διάγνωση και ταξινόμηση του νεοπλασματος βασίζεται στην παθολογοανατομική εξέταση του χειρουργικού παρασκευάσματος της νεφρεκτομής. Το διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα είναι η συχνότερη μορφή ~75% και ακολουθούν το θηλώδες ~15% και το χρωμόφοβο ~5%. Πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στην ανάπτυξη του RCC με το PI3K/AKT/mTOR να είναι το πιο σημαντικό. Το οξειδωτικό στρες μέσω ανισορροπίας των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) επάγει την παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών όπως οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 2 από τις 8 υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, την GPX1 και GPX3 με ανοσοϊστοχημική μέθοδο σε 32 διαυγοκυτταρικά καρκινώματα από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το 62,5% των ασθενών ήταν άνδρες και το 37,5% γυναίκες. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των GPX-1 και GPX-3 πρωτεϊνών και των διάφορων κλινικών και δημογραφικών χαρακτηριστικών εξετάστηκε δοκιμασίες Spearman's Rank-Order και Point-Biserial Correlation κατά περίπτωση. Δεν βρέθηκε συσχέτιση του γινομένου έκφρασης της GPX1 με την ηλικία, το φύλο, την εντόπιση του όγκου και το μέγεθος του όγκου καθώς επίσης και με την διήθηση της κάψας και την διήθηση της πυέλου $p > 0.05$. Ωστόσο, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της GPX1 με τον πυρηνικό βαθμό διαφοροποίησης Fuhman ($p = 0.001$), με την διήθηση της νεφρικής φλέβας ($p = 0.038$), την διήθηση του περινεφρικού λίπους ($p = 0.043$) και την διήθηση του περιπελκικού λίπους ($p = 0.015$). Επίσης όταν έγινε σύγκριση της έκφρασης της GPX1 μεταξύ καρκινωμάτων Fuhman 1 και 2 και καρκινωμάτων Fuhman 3 και 4 βρέθηκε ότι εκφράζεται περισσότερο στο 3- 4 και αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό ($p = 0,001$). Σχετικά με την GPX3, η ανοσοϊστοχημική της έκφραση συσχετίζεται αρνητικά με τον πυρηνικό βαθμό διαφοροποίησης Fuhman ($p = 0.000$). Συγκεκριμένα η έκφραση της GPX3 μειώνεται όσο αυξάνει ο πυρηνικός βαθμός διαφοροποίησης Fuhman.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών GPX1 και GPX3 στο διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα συσχετίζεται με ιστοπαθολογικούς προγνωστικούς παράγοντες και ειδικότερα με το βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης κατά Fuhman. Περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων αυτών, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και αξιολόγηση περισσότερων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων, θα μπορούσε να συνεισφέρει σε πληρέστερη αξιολόγηση της δράσης των GPX1 και GPX3 στο

διαγνοστικό καρκίνωμα του νεφρού και να αναδείξει ενδεχομένως νεότερους πιθανούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς ιστικούς βιοδείκτες.

ABSTRACT

Renal cell carcinoma is the most common renal cancer form. It affects men 1,5 to 2 times more frequently to women and with a mean age of diagnosis 64 years for sporadic and younger for hereditary forms. Geographical heterogeneity is common. Age, gender, lifestyle choices, comorbidities, environmental and genetic factors are considered as risk factors, but cigarette smoking, hypertension and obesity are the most common. Renal cell carcinoma is mostly diagnosed through imaging methods. TNM and Furhman grading systems are used for diagnosis. Clear cell renal cell carcinoma is the most common form ~75%, followed by papillary ~15% and chromophobe ~5% subtypes. PI3K/AKT/mTOR is one of the main signaling pathways implicated in renal cell carcinoma development. Adittionaly, the presence of oxidative stress leads to the activation of antioxidant proteins such as glutathione peroxidases (GPXs).

In the present study, we investigated the immunohistochemical expression of GPXs proteins in 32 renal cell carcinoma cases, clear cell type. Histological sections from the neoplastic tumor, nuclear grade 1-4 according to Furhman were studied. For the expression of GPX1 and GPX3, each case was evaluated microscopically and a histological immunoscore was given for each marker. The Statistical analysis was performed with test Spearman's Rank-Order και Point-Biserial Correlation to evaluate the results and the correlations

No statistically significant corellations were observed between GPX-1 expression and age, sex, tumor localization and tumor size ($p>0.05$), as well as with capsular infiltration and invasion of renal pelvis ($p>0.05$). Statistically significant positive correlations were shown between GPX1 and Furhman nuclear grade ($p=0.001$), invasion of renal vein ($p= 0.038$), invasion of perirenal fat ($p=0.043$) and invasion peripyelic fat ($p=0.015$). Moreover, the immunoexpression of GPX1 was more pronounced in tumors of grade 3-4 than in cases with nuclear grade 1 and 2 and this was statistically significant ($p=0,001$). GPX3 immunohistochemical expression showed negative significant correlation to Fuhrman nuclear grade ($p=0.000$).

The results of this study suggest that GPX1 and GPX3 in clear cell renal cell carcinoma are associated with histopathological prognostic factors and specifically with Furhman nuclear grade. Further investigation, in large series of patients and evaluation of additional clinical parameters, might probably contribute to further evaluation of the role of GPX1 and GPX3 in clear cell renal cell carcinoma and might possibly reveal novel prognostic and predictive tissue markers.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα (NKK) είναι μια από τις συχνότερες κακοήθειες παγκοσμίως, με το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό επίπτωσης και θνησιμότητας μεταξύ των ουρολογικών όγκων [1].

Η συνηθέστερη μορφή NKK, το διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (Δ- NKK), αφορά στο 65-70% όλων των καρκινωμάτων του νεφρού [2], ενώ υπολογίζεται πως αντιπροσωπεύει το 2-3% όλων των κακοήθων νεοπλασμάτων που εντοπίζονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο [Πίνακας 1.1] [3,4]. Το Δ-NKK συσχετίζεται ιστογενετικά με τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων ουροφόρων σωληναρίων [4,5]. Πρόκειται για αγγειοβριθείς όγκους από κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα που χαρακτηρίζονται από ειδικές κυτταρογενετικές αλλοιώσεις με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του γονιδίου von Hippel-Lindau (VHL) στο χρωμόσωμα 3 [6,7]. Σε 96-97% των περιπτώσεων το καρκίνωμα είναι σποραδικό [8] και εμφανίζεται ως μονήρης μάζα σε ασθενείς ηλικίας μεταξύ έκτης και έβδομης δεκαετίας [9]. Λίγες περιπτώσεις (ποσοστό μικρότερο του 5%) αφορούν σε κληρονομικό καρκίνο [10], με οικογενή κατανομή και εμφανίζονται πρωιμότερα, ως αμφοτερόπλευροι όγκοι.

Υπάρχει απόδειξη γεωγραφικής διακύμανσης [11], με τα υψηλότερα ποσοστά συχνότητας στην Ευρώπη, στην Βόρειο Αμερική και στην Αυστραλία και τα χαμηλότερα στην Κίνα, στην Ινδία, στην Ιαπωνία και στην Αφρική [12]. Το ποσοστό ανδρών που διαγιγνώσκονται είναι σχεδόν διπλάσιος από τις γυναίκες (με συχνότητα εμφάνισης 1,5-2,0 φορές μεγαλύτερη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες) [13].

Ταξινόμηση κατά Π.Ο.Υ
Διαυγοκυτταρικό Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα
Πολύχωρο κυστικό νεφρικό νεόπλασμα δυνητικό χαμηλής κακοήθειας
Θηλώδες Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα σχετιζόμενο με κληρονομική λειομυωμάτωση και νεφροκυτταρικό καρκίνωμα
Χρωμόφοβο Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα
Καρκίνωμα αθροιστικών σωληναρίων
Νεφρικό μυελοειδές καρκίνωμα
MiT οικογενειακής μετατόπισης
Ηλεκτρική αφυδρογονάση – ατελής νεφροκυτταρικό καρκίνωμα
Βλεννώδες, σωληνώδες και ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα
Σωληνοκυστικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα σχετιζόμενο με την επίκτητη κυστική νόσο
Διαυγοκυτταρικό θηλώδες νεφροκυτταρικό καρκίνωμα

Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, αταξινόμητο
Θηλώδες αδένωμα
Ογκοκύττωμα

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση του παγκόσμιου οργανισμού υγείας [ΠΟΥ] 2016 για τους νεφροκυτταρικούς κακώθες [μέρος του πίνακα από τη βιβλιογραφία 14]

Το διαυγοκυτταρικό, το θηλώδες και το χρωμόφοβο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα διαφέρουν μεταξύ τους σε ιστολογικό/μορφολογικό, κλινικό αλλά και μοριακό επίπεδο [15].

1.2 Το διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (ΔΝΚΚ)

Το ΔΝΚΚ είναι κακοήθης επιθηλιακό νεόπλασμα του νεφρού, αποτελούμενο από κύτταρα με διαυγές ή ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Είναι ο πιο κοινός τύπος ΝΚΚ και αφορά στο το 70% έως 80% όλων των καρκινωμάτων του νεφρού [16]. Απαντάται συνήθως η σποραδική του μορφή ενώ σπανιότερα είναι οικογενές.

1.3 Αιτιολογία-Παράγοντες Κινδύνου Δ-ΝΚΚ

Η ηλικία και το φύλο συνδέονται στενά με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΝΚΚ [17]. Οι πιο γνωστοί παράγοντες κινδύνου για το ΝΚΚ είναι το κάπνισμα, η παχυσαρκία και η υπέρταση [18]. Επιπλέον, το ΝΚΚ φαίνεται να είναι συχνότερο σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου ή με επίκτητη νεφρική κυστική νόσο και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, εκείνοι που είχαν μεταμόσχευση νεφρού ή σε άτομα με σύνδρομο οξώδης σκλήρυνσης [18].

Οι πιθανοί παράγοντες κινδύνου, περιλαμβάνουν παράγοντες όπως ο τρόπος ζωής, η συννοσηρότητα, τα φάρμακα και οι περιβαλλοντικές αιτίες [πίνακας 1.2] [17].

- Τρόπος ζωής:

- 1) **Κάπνισμα:** ο πιο καθιερωμένος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του ΝΚΚ είναι το κάπνισμα [19].
- 2) **Δείκτης μάζας σώματος – παχυσαρκία:** στον τομέα της πρόληψης του καρκίνου, η παχυσαρκία είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία καρκινογένεσης, μετά το κάπνισμα. Η παχυσαρκία είναι ένας πολύ γνωστός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του ΝΚΚ [20]. Το βάρος και ο κίνδυνος ΝΚΚ φαίνεται να ακολουθούν μια σχέση δόσης-απόκρισης [19].

- 3) Σωματική δραστηριότητα: οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το 9% των περιπτώσεων θα μπορούσαν να είχε αποφευχθεί με την αύξηση της σωματικής δραστηριότητας [21]. Η χαμηλή σωματική δραστηριότητα αναφέρεται ως παράγοντας κινδύνου για το ΝΚΚ στις δυτικές χώρες [22].
- 4) Διατροφή : εκτός από την παχυσαρκία, η διατροφή μπορεί επίσης να επηρεάσει την ανάπτυξη του ΝΚΚ, ιδιαίτερα εκείνη που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και ζωικά λίπη και είναι χαμηλή σε φρούτα και λαχανικά [23].
- 5) Αλκοόλ και άλλα υγρά: η πρόσληψη αλκοολούχων ποτών σχετίζεται αντιστρόφως με χαμηλότερο κίνδυνο νεφροκυτταρικού καρκινώματος, με μέτρια κατανάλωση να παρέχει την προστασία ενώ υψηλότερη κατανάλωση δεν παρέχει πρόσθετα οφέλη [24]. Η ανάλυση των DY Song et al έδειξε ότι η πρόσληψη ~ 15g αιθανόλης ανά ημέρα θα μπορούσε να προκαλέσει μείωση του κινδύνου [24]. Η πρόσληψη είναι παρόμοια για μύρα, κρασί, ποτό [24]. Έχουν προταθεί αρκετοί βιολογικοί μηχανισμοί που πιθανώς παίζουν ρόλο στη μεσολάβηση της σχέσης μεταξύ πρόσληψης αλκοόλ και μειωμένου ΝΚΚ [25]. Η μελέτη των Jinfu Hu et al δεν βρήκε συσχέτιση του ΝΚΚ με εμφιαλωμένο νερό, νερό βρύσης, τσάι, αναψυκτικά ή γάλα [26].
- 6) Καφές: σε πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη περίπτωσης βρέθηκε ότι η κατανάλωση καφέ με καφεΐνη σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ΝΚΚ, ενώ ο καφές χωρίς καφεΐνη συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο, για το επιθετικό διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα [18].

- Συννοσηρότητα

- 1) Υπέρταση: η υπέρταση είναι ένας καλά καθιερωμένος παράγοντας κινδύνου για το καρκίνο των νεφρών και επικρατεί στους μαύρους από ότι τους λευκούς [27]. Σε μια μελέτη αναφέρθηκαν εκτιμήσεις κινδύνου συνδυαστικά στα δύο φύλα και τα άτομα με συστολική $\geq 160\text{mmHg}$ ή διαστολική $\geq 100\text{mmHg}$ υπέρταση είχαν περισσότερο από το διπλάσιο κίνδυνο σε σύγκριση με άτομα που είχαν συστολική αρτηριακή πίεση κάτω από 120mmHg και διαστολική κάτω από 80mmHg , αντίστοιχα [28]
- 2) Πέτρες: η μελέτη των Cheungprasitpor et.al συμπέρανε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντικά αυξημένος κίνδυνος για ΝΚΚ και στο μεταβατικό καρκίνωμα κυττάρων (TCC) σε ασθενείς με πέτρες στα νεφρά, ωστόσο ο κίνδυνος αυτός παρατηρήθηκε μόνο σε άνδρες ασθενείς [29].
- 3) Διαβήτης: Στη μελέτη των Hee- Kyung Joh et al ο διαβήτης τύπου 2 συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο νεφροκυτταρικού καρκινώματος [30].
- 4) Χρόνιες νεφρικές παθήσεις: έως το ένα τρίτο των ασθενών με ΝΚΚ έχει και χρόνια νεφρική πάθηση (CKD) [31]. Ενώ άλλοι ιατρικοί παράγοντες όπως η νεφρική νόσος τελικού σταδίου, ιδίως σε συνδυασμό με την επίκτητη νεφρική κυστική νόσο (ARCD), θεωρείται ότι αυξάνουν

τον κίνδυνο για ΝΚΚ [28]. Φαίνεται ότι η συχνότητα εμφάνισης ΝΚΚ να είναι υψηλότερη σε ασθενείς με επίκτητη νεφρική κυστική νόσο (ARCD) από ότι στο γενικό πληθυσμό [28].

5) Αναπαραγωγικοί και ορμονικοί παράγοντες: Δεν είναι σαφές εάν οι αναπαραγωγικοί και ορμονικοί παράγοντες παίζουν ρόλο [32].

- Αναλγητικά και φάρμακα:

Η αναλγητική χρήση αυξάνει τον κίνδυνο για ΝΚΚ [17]. Αν και η ασπιρίνη είναι νεφροτοξική για τον άνθρωπο και για αυτό είναι δυνητικά νεφροκαρκινογόνος ουσία [33]. Μέχρι σήμερα, δύο μετα-αναλυτικές κριτικές σχετικά με τη χρήση της ασπιρίνης και τα νεφρά έχουν αναφερθεί σε κίνδυνο καρκίνου, ενώ δύο κριτικές παρατήρησαν μη στατιστικό σημαντικό αυξημένο κίνδυνο, με σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών [34]. Ενώ τα ευρήματα των Sara Kamari et al για ΜΣΑΦ (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα) και την ασπιρίνη ήταν μηδενικά, επίσης προέκυψε ότι η χρήση ακεταμινοφαίνης μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ΝΚΚ [34].

Οι στατίνες είναι γενικά χρησιμοποιούμενα φάρμακα για τη θεραπεία των λιπιδικών διαταραχών, ιδιαίτερα υπερχοληστερολαιμίας [35]. Η βιβλιογραφία υποδηλώνει ότι η λήψη φαρμάκων στατίνης μπορεί να σχετίζεται με βελτιωμένα αποτελέσματα στο ΝΚΚ μέσω της υποτιθέμενης αντι-νεοπλασματικής δράσης και των νεφρο-προστατευτικών ιδιοτήτων [36].

- Περιβαλλοντικοί παράγοντες:

Σε σύγκριση με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ο νεφροκυτταρικός καρκίνος δεν έχει συνδεθεί πειστικά με οποιοδήποτε επαγγελματική έκθεση [35]. Αν και, έχει παρατηρηθεί ως επαγγελματική ασθένεια σε περιπτώσεις πολύ υψηλής έκθεσης σε τριχλωροαιθυλένιο έχοντας οδηγήσει σε συμπτώματα νάρκωσης ή προνάρκωσης [37]. Παρόλο που τα στοιχεία είναι περιορισμένα, η έκθεση σε ακτινοβολία χ και οι βιομηχανικοί παράγοντες ακτινοβολίας γ, συμπεριλαμβανομένου του αρσενικού, ανόργανες ενώσεις αρσενικού, κάδμιο, υπερφθοροοκτανοϊκό οξύ, καπνοί συγκόλλησης, νιτρικά και ραδόνια σε πόσιμο νερό, δεν θεωρούνται πιθανοί παράγοντες κινδύνου ΝΚΚ [17]. Ωστόσο, απαιτούνται πιο εύρωστες μελέτες για να επιβεβαιώσουν αυτά τα ευρήματα [17].

Παράγοντες κινδύνου	Συσχέτιση	Παρατήρηση
Καθιερωμένοι*		
Κάπνισμα τσιγάρων	Θετική	<ul style="list-style-type: none">• Σχέσης δόσης- απόκρισης με τα πακέτα ανά έτος.• Η διακοπή του καπνίσματος μειώνει τον κίνδυνο.

Υπερβολικό σωματικό βάρος	Θετική	<ul style="list-style-type: none"> Σχέσης δόσης- απόκρισης με το συνήθη ΔΜΣ ενηλίκων. Η επίδραση της αλλαγής του βάρους σχετικά με τον κίνδυνο είναι ασαφής.
Υπέρταση	Θετική	<ul style="list-style-type: none"> Σχέσης δόσης- απόκρισης με αρτηριακή πίεση. Ο έλεγχος της υπέρτασης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο. Η επίδραση είναι ανεξάρτητη από το σωματικό βάρος.
Υποπτοιξ		
Σακχαρώδης διαβήτης	Θετική	<ul style="list-style-type: none"> Ανεξάρτητη επίδραση από την παχυσαρκία και την υπέρταση δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί.
Κατάσταση των γυναικών	Θετική	<ul style="list-style-type: none"> Σχέσης δόσης- απόκρισης με τον αριθμό των γεννήσεων.
Φυσική δραστηριότητα	Αντίστροφη	<ul style="list-style-type: none"> Σχέσης δόσης- απόκρισης με το επίπεδο της δραστηριότητας.
Κατανάλωση αλκοόλ	Αντίστροφη	<ul style="list-style-type: none"> Σχέσης δόσης- απόκρισης με την ποσότητα που καταναλώνεται.
Έκθεση σε τριχλωροαιθυλένιο	Θετική	<ul style="list-style-type: none"> Σχέσης δόσης- απόκρισης με το επίπεδο της έκθεσης.
<p>* Παρατηρήθηκε σε όλες σχεδόν τις μελέτες, η έκθεση προηγείται του ΝΚΚ, σχέση δόσης-απόκρισης, μείωση του κινδύνου με την απόσυρση της έκθεσης</p> <p>§ Παρατηρήθηκε σε πολλές μελέτες, αλλά με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε ορισμένες μελέτες, η έκθεση προηγείται της εμφάνισης του ΝΚΚ, και παρατηρείται σχέση δόσης-απόκρισης, με ανεξάρτητη επίδραση σε σχέση με άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου, δυσκολία στην αξιολόγηση της έκθεσης.</p>		

Πίνακας 1.2: Παράγοντες κινδύνου του Νεφροκυτταρικού καρκινώματος [38].

1.4 Κλινική εικόνα Δ-ΝΚΚ

Πάνω από το 50% των νέων περιπτώσεων Δ-ΝΚΚ ανιχνεύεται τυχαία σε ασυμπτωματικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε απεικόνιση κοιλίας για κάποιο άλλο λόγο [39,40]. Η συχνότητα εμφάνισης ασυμπτωματικών ασθενών έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, ειδικότερα σε ασθενείς άνω των 70 ετών [41].

Η αξονική τομογραφία (CT) και η μαγνητική τομογραφία (MRI) είναι οι συνήθεις διαγνωστικές εξετάσεις για την προεγχειρητική διάγνωση του Δ-ΝΚΚ και προσφέρουν ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τη σταδιοποίηση του όγκου [3, 42].

Αν και για μεγάλο χρονικό διάστημα το Δ-ΝΚΚ μπορεί να παραμείνει ασυμπτωματικό [12], ωστόσο κάποιοι από τους ασθενείς εμφανίζουν πόνο, αιματουρία ή σπανιότερα ψηλαφητή κοιλιακή μάζα που σχετίζεται με προχωρημένο κλινικό στάδιο και επιθετική βιολογική πορεία της νόσου [39,40,43,12]. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν την απώλεια βάρους, υπέρταση,

νυχτερινή εφίδρωση, αδιαθεσία και νέα έναρξη κίρσοκλήλης [12]. Πυρετός, αναιμία, υπερασβεστιαμία, ερυθροκυττάρωση, ανευρίσκονται στο 30% περίπου των ασθενών [40], ενώ έχουν περιγραφεί και σπανιότερες παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις, όπως αύξηση ηπατικών ενζύμων (σύνδρομο Stauffer), αμυλοείδωση και πολυνευροπάθεια [12].

Τέλος, σε ασθενείς που διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο ενδέχεται να προεξάρχουν συμπτώματα λόγω μεταστατικής νόσου, όπως για παράδειγμα πόνος στα οστά ή επίμονος βήχας [40].

1.5 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ Δ-ΝΚΚ

1.5.1 Μακροσκοπική εικόνα

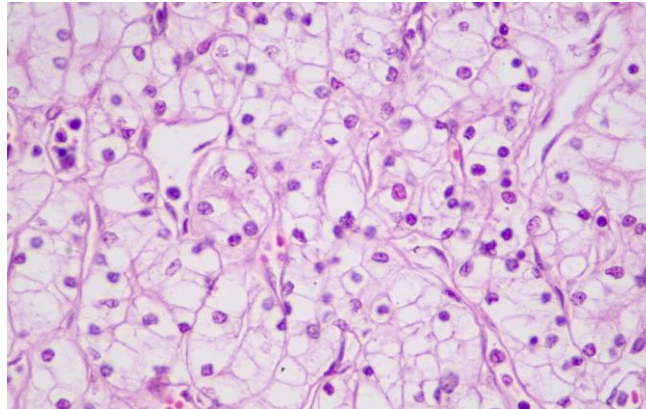
Τα ΔΝΚΚ συνήθως είναι μονήρεις μονόπλευροι όγκοι του νεφρού. Έχουν σαφώς περιγεγραμμένα όρια, καθώς απωθούν τον περιβάλλοντα μη νεοπλασματικό ιστό και παρουσιάζουν πορτοκαλοκίτρινη χροιά στην επιφάνεια διατομής, η οποία οφείλεται στα λιπίδια του κυτταροπλάσματος των καρκινωματοδών κυττάρων. Συχνά παρουσιάζουν αιμορραγία, νέκρωση και ασβεστοποίηση. Μεγάλοι όγκοι ενδέχεται να εμφανίζουν διήθηση της νεφρικής φλέβας ή/και σαρκωματοώδη διαφοροποίηση, η οποία μακροσκοπικά εμφανίζεται ως συμπαγής περιοχή με μαλακή σύσταση [εικόνα 1.1]. Το ΔΝΚΚ μπορεί να παρουσιάζει επίσης κυστική εκφύλιση. Πολυεστιακοί, αμφοτερόπλευροι, κυστικοί όγκοι με μορφολογία ΔΝΚΚ, απαντώνται συχνότερα σε άτομα με νόσο VHL ή οζώδη σκλήρυνση [16].



Εικόνα 1.1: Μακροσκοπική φωτογραφία αποκαλύπτοντας τη κομμένη επιφάνεια του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος με χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Ο όγκος υποδιαιρείται σε ακανόνιστα οζίδια από ινώδη διαφράγματα. Οι περιοχές με αιμορραγία και ο κυστικός εκφυλισμός είναι εμφανείς [11].

1.5.2 Μικροσκοπική χαρακτηρισ

Στην ιστολογική εξέταση το ΔΝΚΚ παρουσιάζει συμπαγές, σωληνωδοκυστικό, ή κυψελιδώδες πρότυπο ανάπτυξης με εστιακή παρουσία ψευδοθηλών. Το στρώμα είναι έντονα αγγειοβριθές. Το μέγεθος των νεοπλασματικών κυττάρων είναι περίπου διπλάσιο απ' αυτό των κυττάρων του φυσιολογικού επιθηλιακού σωληναρίου. Τα καρκινωματώδη κύτταρα εμφανίζουν σαφή κυτταρικά όρια και διαυγές κυτταρόπλασμα που οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση γλυκογόνου και λιπιδίων [εικόνα 1.2] [14].



Εικόνα 1.2: Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού. Παρατηρούνται αθροίσεις καρκινωματώδων κυττάρων με διαυγές κυτταρόπλασμα και μέτρια πυρηνική ατυπία μέσα σε αγγειοβριθές υπόστρωμα. (Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης, μεγέθυνση X20)

Σπανιότερα, ο όγκος μπορεί να παρουσιάζει αγγειολομοιωματώδη μορφολογία ή ψευδοαγγειακό πρότυπο ανάπτυξης λόγω απώλειας της κυτταρικής συνοχής [44,45,46].

Στην ανοσοϊστοχημική μελέτη τα κύτταρα του όγκου είναι θετικά στον επιθηλιακό δείκτη pankeratin, στο CD10, στη Vimentin, στο EMA, και παρουσιάζουν διάχυτη μεμβρανική έκφραση καρβονικής ανυδράσης (CA) IX. Νεότεροι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του διαυγοκυτταρικού ΝΚΚ είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες PAX-8 PAX-2 και ο hKIM-1 (Human Kidney Injury Molecule-1). Οι δείκτες αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, πρέπει όμως να αξιολογούνται σε συνδυασμό με την μορφολογία και τα κλινικά δεδομένα, αφού είναι δυνατόν να εκφράζονται και σε άλλα καρκινώματα [47,48].

1.6 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΟ ΔΝΚΚ

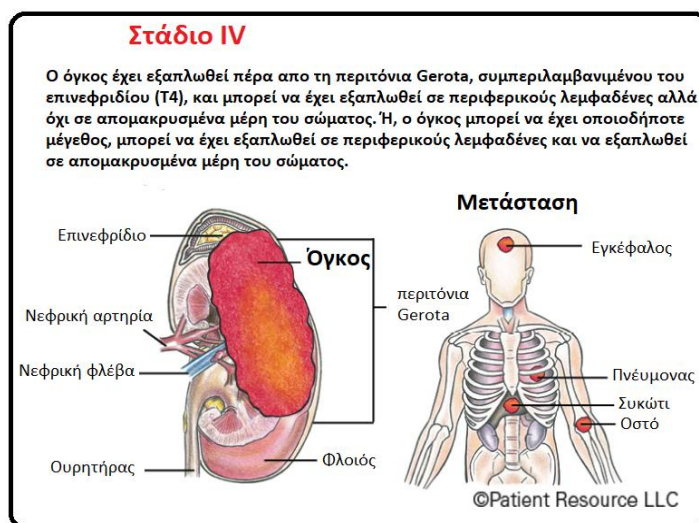
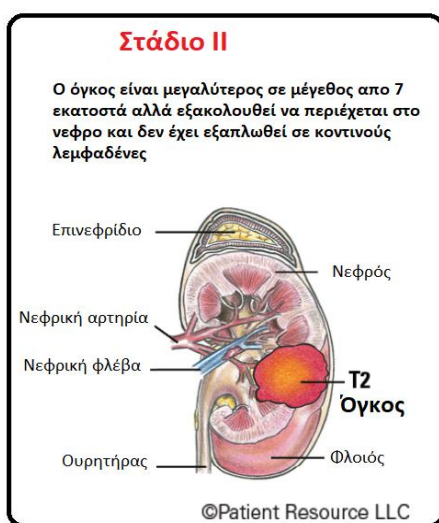
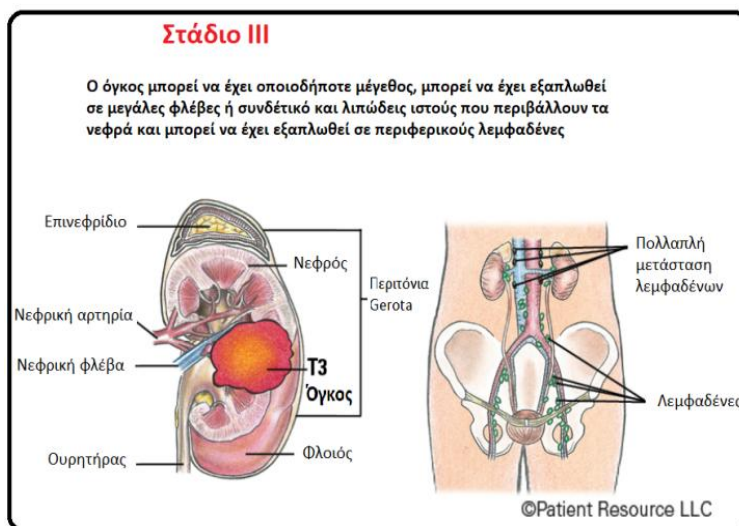
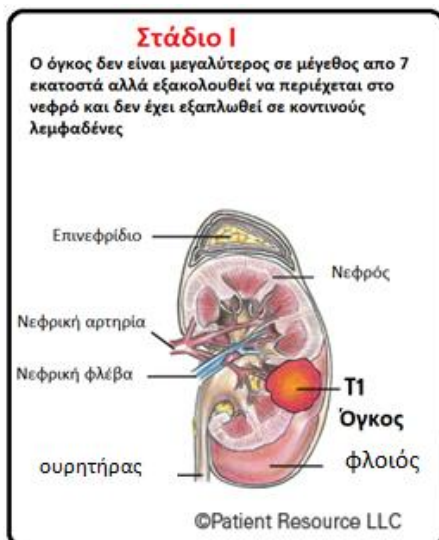
1.6.1 Σταδιοποίηση TNM

Η σταδιοποίηση του καρκίνου είναι η διαδικασία προσδιορισμού του μεγέθους του πρωτοπαθούς όγκου και της έκτασης εξάπλωσης του [49]. Η σταδιοποίηση του όγκου προσφέρει εκείνες τις πληροφορίες που καθορίζουν, ανάλογα και με την ιστολογική διάγνωση την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης [49,50]. Η σταδιοποίηση TNM της Αμερικανικής Συντονιστικής Επιτροπής του Καρκίνου (American Joint Committee on Cancer, AJCC)[50] και της Ένωσης για το Διεθνή Έλεγχο του Καρκίνου (Union for International Cancer Control, UICC) [18] είναι το συνηθέστερο, χρησιμοποιούμενο και παγκοσμίως αποδεκτό σύστημα σταδιοποίησης για τον καρκίνο [49]. Είναι απλό, περιεκτικό και αναπαραγώγιμο [49]. Η πρώτη δημοσίευση της ταξινόμησης έγινε το 1977, και έχει υποστεί διάφορες αλλαγές έως την 8^η έκδοση της (1^η Ιανουαρίου 2018) η οποία χρησιμοποιείται σήμερα [49] [πίνακας 1.3 και εικόνα 1.3].

8η UICC TNM σταδιοποίηση ΝΚΚ		
T – Πρωτοπαθής όγκος		
TX		Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0		Καμιά ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
T1		Όγκος μέγιστης διαμέτρου ≤ 7 εκ, εντοπισμένος στο νεφρό
	T1α	Όγκος 4 εκ ή μικρότερος
	T1β	Όγκος μεγαλύτερος από 4 εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 7 εκ.
T2		Όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου από 7 εκ., περιορίζεται στο νεφρό
	T2α	Όγκος μεγαλύτερος από 7 εκ αλλά όχι μεγαλύτερος από 10εκ.
	T2β	Όγκος μεγαλύτερος από 10 εκ., περιορίζεται στο νεφρό
T3		Ο όγκος διηθεί τη νεφρική φλέβα ή περινεφρικούς ιστούς αλλά όχι το σύστοιχο επινεφρίδιο και όχι πέραν της περιτονίας Gerota
	T3α	Ο όγκος διηθεί τη νεφρική φλέβα ή τμηματικούς κλάδους της, ή ο όγκος διηθεί το πυελοκαλυκτικό σύστημα ή όγκος που διηθεί το περινεφρικό και/ ή το περιπυελικό λίπος αλλά όχι πέραν από την περιτονία Gerota
	T3β	Ο όγκος επεκτείνεται εντός της κοίλης φλέβας κάτω από το διάφραγμα
	T3γ	Ο όγκος επεκτείνεται εντός της κοίλης φλέβας πάνω από το διάφραγμα ή διηθεί το τοίχωμα της κοίλης φλέβας

T4		Ο όγκος διηθεί πέραν της περιτονίας Gerota (συμπεριλαμβανομένης και της διήθησης κατά συνέχεια ιστού στο σύστοιχο επινεφρίδιο)	
N- Επιχώριοι λεμφαδένες			
NX	Οι λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν		
N0	Χωρίς μετάσταση λεμφαδένων		
N1	Μετάσταση σε επιχωριους λεμφαδένα (εσ)		
M – Απομακρυσμένη μετάσταση			
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις		
M1	Με απομακρυσμένες μεταστάσεις		
pTNM παθολογοανατομική σταδιοποίηση^α			
Στάδια			
Στάδιο I	T1	N0	M0
Στάδιο II	T2	N0	M0
Στάδιο III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Στάδιο IV	T4	Οποιοδήποτε N	M0
	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1
<p>α. οι κατηγορίες pT και pN αντιστοιχούν στις T και N κατηγορίες. pTNM, παθολογοανατομικό μέγεθος όγκου, επιχώριοι λεμφαδένες, απομακρυσμένη μετάσταση TNM, μέγεθος όγκου, λεμφαδένες, μετάσταση UICC διεθνής ένωση για τον καρκίνο</p>			

Πίνακας 1.3: UICC TNM 8 σταδιοποίηση του ΝΚΚ[18]



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων TNM

[μετάφραση από https://www.patientresource.com/RCC_Staging.aspx][51].

Πρέπει να σημειωθεί ότι μεταξύ όγκων του ίδιου σταδίου η πρόγνωση επηρεάζεται από το ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (grade), καθώς επίσης και από την παρουσία σαρκωματοειδούς μορφολογίας ή ραβδοειδούς διαφοροποίησης. Επίσης η παρουσία πηκτικής νέκρωσης σε ποσοστό > 10% του όγκου έχει συσχετισθεί με μικρότερη συνολική επιβίωση [52].

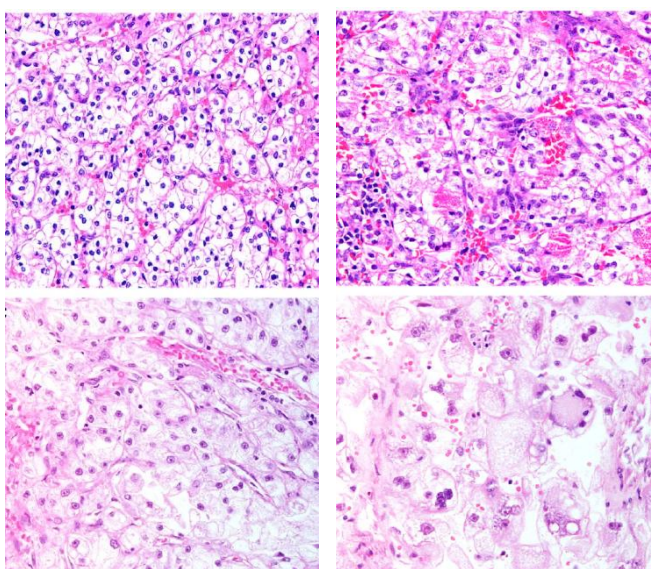
1.6.2 Ιστολογικός Βαθμός Διαφοροποίησης (Histologic grading) [εικόνα 1.4]

Ένας από τους ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για το ΝΚΚ και ιδιαίτερα για το ΔΝΚΚ είναι ο πυρηνικός βαθμός διαφοροποίησης κατά Furthman [53]

Στο σύστημα εκτίμησης του πυρηνικού βαθμού διαφοροποίησης κατά Fuhrman (1982), η ιστολογική τομή του όγκου εξετάζεται σε χαμηλή μεγέθυνση (X10) και αξιολογούνται το μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα, η ποιότητα της χρωματίνης και η παρουσία διακριτού ή όχι πυρηνίου [πίνακας 1. 4] [54]

Grade	Μέγεθος Πυρήνα	Σχήμα Πυρήνα	Χρωματίνη	Πυρήνιο
1	<10 μm	Στρογγυλό	Πυκνή	Μη διακριτό
2	15 μm	Στρογγυλό	Λεπτοκοκκιώδης	Μικρό (μη διακριτό σε μεγέθυνση x10)
3	20 μm	Στρογγυλό / ωοειδές	Αδρή κοκκιώδης	Εμφανές (σε μεγέθυνση x 10)
4	>20 μm	Πλειόμορφο/ πολύλοβο	Υπερχρωμασία	Μακροπυρήνιο

Πίνακας 1.4: Σύστημα εκτίμησης πυρηνικού βαθμού κακοηθείας κατά Fuhrman



Εικόνα 1.4: Βαθμός διαφοροποίησης διανογκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού σε μεγέθυνση X 40. A) βαθμός 1, B) βαθμός 2, C) βαθμός 3 και D) βαθμός 4, που δείχνει έντονη πολυμορφία και με παρουσία πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων [55]

1.7 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΟ Δ-NKK

Το ΔNKK χαρακτηρίζεται κυτταρογενετικά από την απώλεια του χρωμοσώματος 3p, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ετεροζυγωτίας στα τέσσερα ογκοκατασταλτικά γονίδια: von Hippel-Lindau(VHL), PBRM1, SETD2, BAP1 [7] [εικόνα 1.5]. Τα γενετικά χαρακτηριστικά του καρκινώματος περιλαμβάνουν την απενεργοποίηση του γονιδίου VHL, την αρνητική ρύθμιση των πρωτεϊνών που επάγονται από τον παράγοντα υποξίας HIF, καθώς και αλλαγές του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων των χρωμοσώματα 3p, 5q και 14q και υψηλή συχνότητα μετάλλαξης στα ένζυμα τροποποίησης της χρωματίνης (π.χ. PBRM1, SETD2 και BAP1) [56].

Οι δομικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις προάγουν την ογκογένεση μεταβάλλοντας τον αριθμό αντιγράφων των γονιδίων στο γονιδίωμα ή αναδιατάσσοντας τη σειρά του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα, νέα γονίδια ή να μεταβάλλεται η έκφραση ενός γονιδίου [57]. Οι πιο συνήθεις μεταβολές είναι αύξηση του χρωμοσώματος 5 και απώλεια χρωμοσώματος 14, απώλεια χρωμοσώματος 6q, 8p, και 9p και προσθήκες στο χρωμόσωμα 7 [57]. Σύμφωνα με μελέτες στο γονιδίωμα ασθενών με Δ-NKK φαίνεται ότι η σχεδόν καθολική απώλεια του χρωμοσώματος 3p (περίπου στο 90% των περιπτώσεων) και οι προσθήκες στο χρωμόσωμα 5q (περίπου στο 67% των περιπτώσεων) προκύπτουν από μια μόνο χρωμοσωμική θραύση που περιλαμβάνει τα χρωμοσώματα 3 και 5 έως t(3,5) γεγονός το οποίο συμβαίνει δεκαετίες πριν τη διάγνωση του καρκίνου [58]. Επιπλέον, η αύξηση και η εξέλιξη του όγκου με τις συνακόλουθες εκδηλώσεις μεταστατικής νόσου συσχετίζεται με ιδιαίτερες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις όπως είναι η απώλεια του χρωμοσώματος 9p και 14q, όπου εντοπίζονται τα γονίδια CDKN2A και HIF-1α, αντίστοιχα [58].

Σε μοριακό επίπεδο, η αδρανοποίηση του γονιδίου VHL στο χρωμόσωμα 3p25, συμβαίνει μέσω μετάλλαξης ή μεθυλίωσης και έχει αναφερθεί έως και στο 91% των ασθενών με σποραδικό ΔNKK [59,60,61,62,6]. Το γονίδιο VHL είναι ένα υπόστρωμα λιγάσης E3 που σημαίνει τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες, παράγοντες HIF1α και HIF2α, με ουμπικουιτίνη προκειμένου να οδηγηθούν σε αποδόμηση στο πρωτεόσωμα [6]. Η συσσώρευση των παραγόντων HIF έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειογένεσης στο καρκίνωμα [6]. Εκτός από τη βασική λειτουργία ως E3 ουμπικουιτίνη λιγάση, το VHL αυξάνει τη σταθερότητα και την προ-αποπτωτική του δράση του p53 [62].

Πρόσφατες μελέτες με τη χρήση της σύγχρονης μοριακής μεθοδολογίας της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS, next generation sequence) σε μεγάλη σειρά ασθενών με ΔNKK (άτλας γονιδιώματος του καρκίνου-TCGA), έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό επιπρόσθετων γονιδίων που μεταλλάσσονται συχνά στο ΔNKK, όπως PBRM1 (40-50%), SETD2 (12%), BAP1 (10%)

και KDM5C (5%) [6] [πίνακας 1.5]. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και της μεθυλίωσης ιστόνης [6]. Οι κύριοι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της κατάστασης της χρωματίνης είναι η μεθυλίωση του DNA, η αναδιαμόρφωση νουκλεοσωμάτων και ομοιοπολικές τροποποιήσεις ιστόνης μέσω μεθυλίωσης, ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης, ουβικιτίνωσης ή σουμοϋλίωσης [63]. Επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 3p21 στο ΔNKK, συμπεριλαμβάνουν τα γονίδια SETD2, BAP1, PBRM1, KDM6A και παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην καρκινογένεση όσο και στην αύξηση και εξέλιξη του νεφροκυτταρικού καρκινώματος [59].

VHL μετάλλαξη 40-70% των όγκων	Επαγωγή αγγειογένεσης Υποστήριξη αυξημένου κυτταρικού πολ/μου Απορρύθμιση κυτταρικού μεταβολισμού
Γονιδιακή μετάλλαξη για τροποποίηση χρωματίνης 30-50% PBRM1 10-30% SETD2 5-15% BAP1 5-15% KDM5C	Διαταραχή της ρύθμισης
TERT μετάλλαξη 6-14% των όγκων	Χρωμοσωμική γήρανση
Χρωμοσωμακές αλλοιώσεις Χρωμ.14 απώλεια ~40% Χρωμ.9 απώλεια ~30%	Διήθηση και μετάσταση

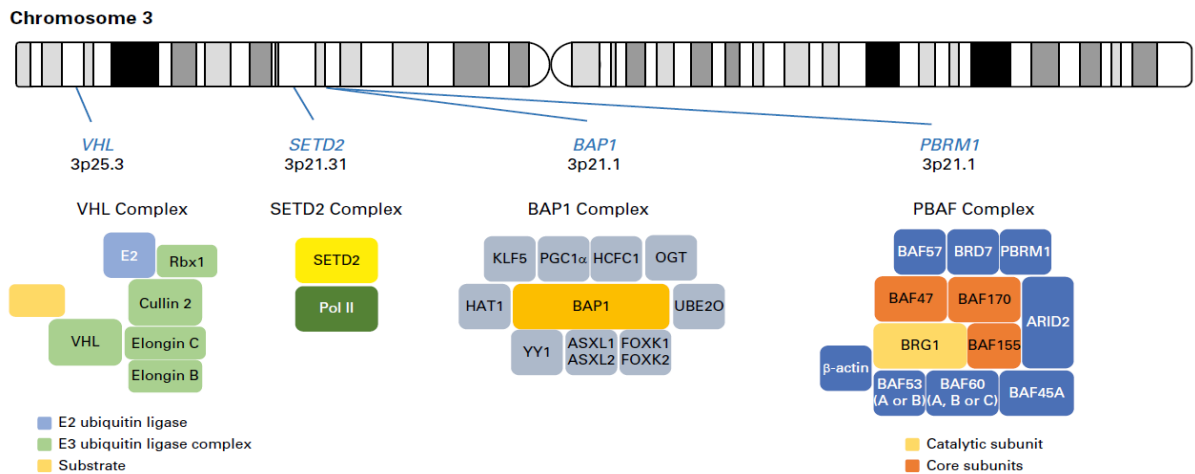
Πίνακας 1.5: Συχνότητες μετάλλαξης των πιο συχνά μεταλλαγμένων γονιδίων στο ΔNKK και οι επιδράσεις τους [57].

Το PBRM1 είναι το δεύτερο πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο μετά το VHL στο ΔNKK [64]. Εντοπίζεται στο 3p21.1 με αριθμό εξονίων 37 [65]. Το PBRM1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BAF180, η οποία είναι υπομονάδα του εξαρτώμενου από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) σύμπλεγμα της αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που ονομάζεται σύμπλεγμα SWI/SNF [66]. Το σύμπλεγμα παίζει ρόλο στην κινητοποίηση νουκλεοσωμάτων με την προώθηση της εισαγωγής ή της απομάκρυνσης των ιστονών από την χρωματίνη [66]. Ωστόσο, οι βιολογικές συνέπειες των μεταλλάξεων PBRM1 στην ογκογένεση των νεφρών είναι εν πολλοίς άγνωστες [64].

Το SETD2 παίζει κρίσιμο ρόλο στη μεθυλίωση της λυσίνης των καρκινικών κυττάρων της ιστόνης H3 (H3K36me3), επηρεάζοντας τις μεταβολικές οδούς [61]. Είναι ένα γονίδιο καταστολής όγκου που απαιτεί και τα δύο αλληλόμορφα και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p, μια περιοχή που διαγράφεται συχνά στο ΔNKK [67]. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p21.31 με αριθμό 26 εξονίων [68]. Το SETD2 που είναι υπεύθυνο για την τριμεθυλίωση του H3K36, απενεργοποιείται σε περίπου 10-32% των περιπτώσεων ΔNΣΣ [69] και προάγει την επιμήκυνση της μεταγραφής και παίζει σημαντικό ρόλο στην επισκευή της διπλής έλικας, της μεθυλίωσης του DNA και στο μάτισμα του RNA [69]. Η ομόζυγη απώλεια της δραστηριότητας SETD2 οδηγεί σε καθολική μείωση των δεικτών ιστόνης και σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής [69]. Το SETD2 φαίνεται ότι διαμεσολαβεί στην διόρθωση βλαβών επιδιορθωτικών ενζύμων DNA (MMR, mismatch repair), στην επισκευή ομόλογου ανασυνδυασμού (HRR, homologous recombination repair) και στην επισκευή διπλού κλώνου DNA (DSB, DNA double-strand break) [70]. Όλα αυτά τα στοιχεία δείχνουν έναν ρόλο του SETD2 στην απόκριση βλάβης του DNA (DDR, DNA damage response) [70].

Η σχετιζόμενη με το γονίδιο BRCA1 πρωτεΐνη 1 (BAP1) είναι μια υδρολάση αποουβικιτίνωσης, και συσχετίζεται με πολλαπλές κυτταρικές οδούς ογκογένεσης [66]. Η πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτική, αν και δεν έχει αποδειχθεί επακριβώς ο μηχανισμός δράσης της [71]. Φαίνεται πάντως ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της απόκρισης σε βλάβης του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική αύξηση, το μεταβολισμό και την ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης [71]. Το BAP1 μεταλλάσσεται στο 5 έως 15% των σποραδικών ΔNKK και σε ορισμένες περιπτώσεις σε ΔNKK βλαστικής γραμμής [66]. Επιπλέον, η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης BAP1 έχει αναγνωριστεί ως δυσμενής προγνωστικός παράγοντας σε ασθενείς με ΔNKK [66]. Τόσο το PBRM1 όσο και το BAP1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p σε μια περιοχή που διαγράφεται σε περισσότερο από το 90% στα ΔNKK [66]. Σε ορισμένες μελέτες, η απώλεια της έκφρασης και των δύο δεικτών είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς με ΔKK [66].

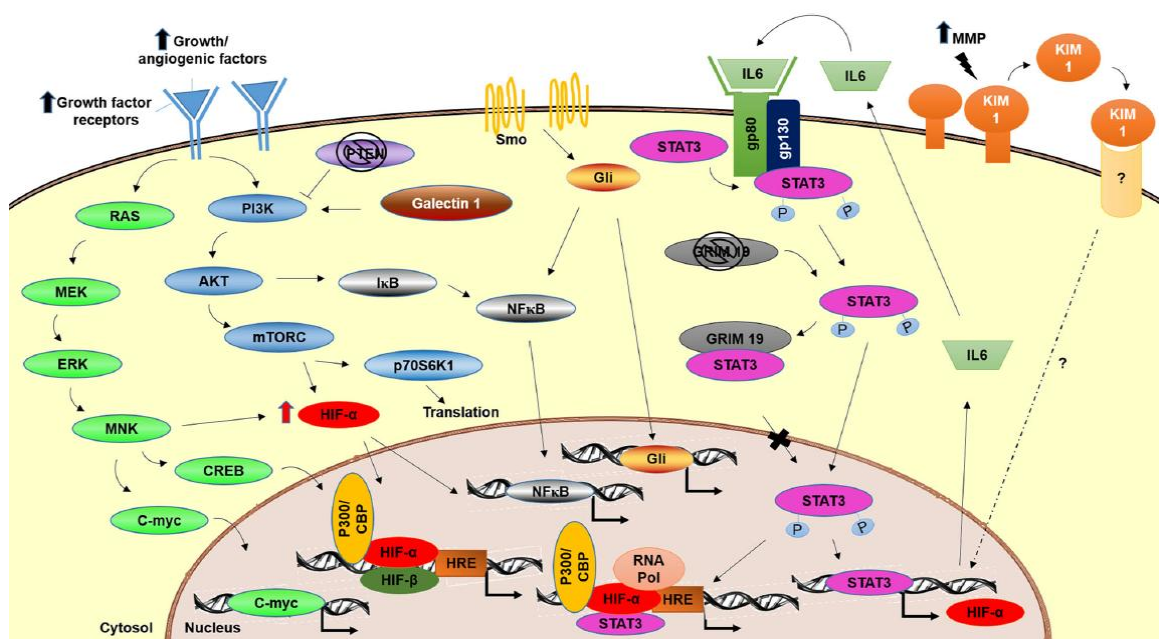
Οι μεταλλάξεις των γονιδίων PBRM1, SETD2, BAP1 θεωρούνται πάντως μεταγενέστερα γονιδιακά φαινόμενα, που σχετίζονται με την εξέλιξη του όγκου και με επιθετικά κλινικά χαρακτηριστικά [61].



Εικόνα 1.5: ΔNKK. Ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά σύμπλοκα τους στο χρωμόσωμα 3p [58.]

1.8 Κύρια Σηματοδοτικά Μονοπάτια στο Δ-NKK [εικόνα 1.6]

Το μονοπάτι HIF/υποξίας ήταν μια από τις πρώτες οδούς που εντοπίστηκαν στο ΔNKK [72]. Το φαινόμενο Warburg (αερόβια γλυκόλυση), οι ανωμαλίες στη σύνθεση αργινίνης, που προκαλούνται από ανεπάρκεια συνθετάσης- αργινουηλεκτρικού άλατος και ο επαναπρογραμματισμός της οδού γλουταμίνης έχουν περιγραφεί στο ΔNKK [72]. Τα μονοπάτια VHL/HIF και PI3K/AKT διασταυρώνονται σε ένα μεγάλο δίκτυο σηματοδότησης, συμβάλλοντας έτσι στην καρκινογένεση του ΔNKK [73].



Εικόνα1.6: Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο ΔΝΚΚ. Οι αυξητικοί παράγοντες και οι υποδοχείς τους οδηγούν σε καθοδική ενεργοποίηση MARK, mTOR και NF- κ B σηματοδοτικά μονοπάτια. Ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS/MEK/ERK (εμφανίζεται με πράσινο χρώμα) μέσω των καθοδικών πρωτεϊνικών τελεστών (c-myc, CREB) οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το ενεργοποιημένο μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR (εμφανίζεται με μπλε χρώμα) ενισχύει την κυτταρική μετάφραση στοχεύοντας στο S6K1 και στην ριβοσωμική σύνθεση. PTEN, ο αναστολέας του μονοπατιού mTOR υπάρχει σε μειωμένο ποσό στο Δ-ΝΚΚ. Ωστόσο, Galectin1, ενισχυτής μονοπατιού mTOR, έχει αυξημένη έκφραση. Εκτός από αυτό, και τα δύο μονοπάτια αυξάνουν τον παράγοντα HIF- α , προωθώντας έτσι την εξέλιξη του όγκου. Το STAT3 εκτός από την άμεση ενεργοποίηση των γονιδίων που προάγουν τον όγκο δεσμεύεται επίσης συνεργατικά με το HIF-A για την ενίσχυση της παραγωγής HIF-A στοχευόμενου γονιδίου. Το μονοπάτι NF- κ B ενεργοποιείται από το TGF- α που ενισχύει περαιτέρω την ανάπτυξη όγκου και της φλεγμονής. Επίσης, η επανενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης sonic hedgehog (SHH), (μέσω τελεστών Smo και Gli πρωτεϊνών) έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση. Επιπλέον, άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία εμπλέκουν την IL-6, το STAT3 και GRIM19, συμμετέχουν επίσης στην καρκινογένεση και εξέλιξη στο ΔΝΚΚ [74].

1.8.1 Μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR

Το PI3K/AKT είναι ένα σημαντικό μονοπάτι σηματοδότησης που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού [75].

Το μονοπάτι PI3K/Akt περιλαμβάνει πολλαπλές ενδοκυττάρειες οδούς και καταρράκτες κινασών, που εμπλέκονται τόσο στην καρκινογένεση όσο και στην εξέλιξη του ΔΝΚΚ [61, 75]. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα έχει συσχετιστεί με επιθετική βιολογική πορεία και δυσμενή πρόγνωση [76] και για το λόγο αυτό αποτελεί γονιδιακό θεραπευτικό στόχο [73].

Η καταλυτική υπομονάδα του PI3K, p110 α , είναι γονίδιο το οποίο αποτελεί θεραπευτικό στόχο στη σύγχρονη στοχεύουσα θεραπεία των όγκων [73]. Το PI3K ενεργοποιείται με εξωκυττάρια σήματα σε φυσιολογικές συνθήκες [73]. Μια πληθώρα ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, των κυτοκινών και των ορμονών μπορεί να ενεργοποιήσουν το PI3K [73]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο VHL ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης Akt/mTOR, το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει τον παράγοντα HIF και επάγει την αγγειογένεση στον όγκο [13].

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της οδού PI3K/Akt/mTOR [13]. Η απώλεια PTEN έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αναστολέων τυροσινικής κινάσης (TKI) [13]. Αν και οι μεταλλάξεις του γονιδίου PTEN είναι σπάνιες στο ΔΝΚΚ [13], ωστόσο, η έκφρασή έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται συχνά [13], γεγονός το οποίο προκύπτει από άλλα γενετικά φαινόμενα όπως η μεθυλίωση προαγωγέα, αναστολή μεταγραφής, έλεγχο microRNA και μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ρύθμιση των λειτουργιών PTEN και την επακόλουθη ενίσχυση της σηματοδότησης PI3K/AKT [73].

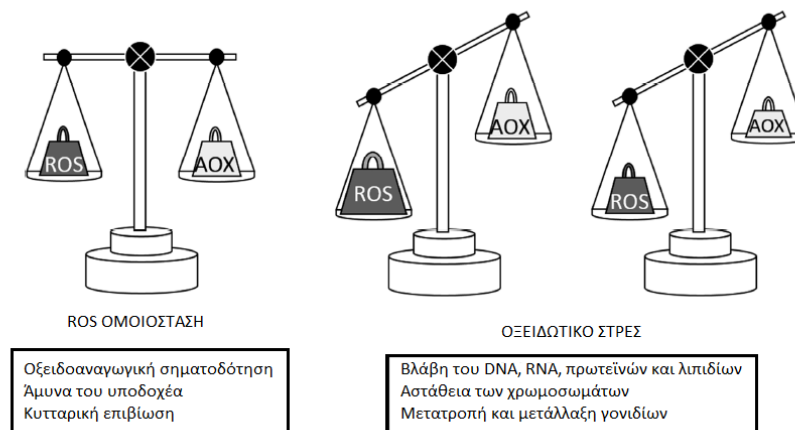
Η σηματοδότηση mTOR μπορεί να αυξηθεί μέσω πολλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της υπερέκφρασης ή της ενεργοποίησης των υποδοχέων αυξητικού παράγοντα, ενεργοποίηση μεταλλάξεων στο PI3K/Akt, ή μειωμένη έκφραση γονιδίων καταστολής όγκου της οξώδους σκλήρυνσης TSC1/2, γονίδια καταστολής όγκων PTEN ή Von Hippel –Lindau (VHL) [76]. Η υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων όπως του VEGF σε κύτταρα όγκου με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση της σηματοδότησης mTOR σε γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε αυξημένη αγγειογένεση [76]. Το μονοπάτι mTOR ρυθμίζει επίσης τη μετάφραση του mRNA για τους παράγοντες υποξίας HIF-1a και HIF-2a, η υπερέκφραση των οποίων να είναι κρίσιμο βήμα στην ογκογένεση του ΔNKK [76].

Η PI3K/Akt σηματοδότηση (πρωτεϊνική κινάση B), που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, επηρεάζεται επίσης από την παρουσία ελεύθερων ριζών (ROS) [77]. Είναι ενδιαφέρον, ότι οι ROS μπορούν να καταστείλουν τη δραστηριότητα της φωσφατάσης και του ομόλογου της τενσίνης (PTEN), που αναγνωρίζονται ως αναστολέας της σηματοδότησης PI3K/Akt [77]. Η σηματοδότηση PI3K/Akt σχετίζεται επίσης με διάφορες κακοήθειες συμπεριφορές, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της αγγειογένεσης και της ανθεκτικότητας στην χημειοθεραπεία [77]. Έτσι, οι ROS μπορούν να ρυθμίζουν τις δραστηριότητες των οδών που σχετίζονται με τον καρκίνο, μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών [77].

1.9 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – ROS – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

1.9.1 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής προ-οξειδωτικών και της ικανότητας του σώματος να εμποδίζει τις επιβλαβείς επιπτώσεις τους μέσω της εξουδετέρωσης τους από τα αντιοξειδωτικά [78]. Τα παράγωγα των προ-οξειδωτικών μπορεί να είναι ελεύθερες ρίζες και δραστηριοί μεταβολίτες [77] [εικόνα 1.7].



Εικόνα 1.7: Οξειδωτικό στρες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή προ- και αντιοξειδωτικών βρίσκεται σε σταθερή ισορροπία. Η υπερβολική παραγωγή ROS ή η μείωση των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι αιτία οξειδωτικού στρες, το οποίο μπορεί να βλάψει τα κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA, με το τελευταίο να οδηγεί σε χρωμοσωμιακή αστάθεια και γονιδιακές μεταλλάξεις [77].

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικά και βραχύβια είδη και η άμεση μέτρηση τους συνήθως δεν είναι δυνατή. Ωστόσο, εκατοντάδες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι γνωστές ότι προέρχονται από την αλληλεπίδραση των ελεύθερων ριζών με βιομόρια [78]. Ελεύθερες ρίζες είναι δραστικές μορφές οξυγόνου, (ROS), ειδικά υπεροξειδία και υδροϋπεροξειδία, δραστικές μορφές αζώτου (RNS), ειδικά νιτρικά οξείδια (NO) και δραστικές μορφές θείου (RSS). Η ελεγχόμενη παραγωγή των ελεύθερων ριζών στο φυσιολογικό οργανισμό είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων και συμβάλλει στη βέλτιστη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η περίσσεια αυτών εντούτοις, ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου [79]. Συγκεκριμένα, οι διαταραχές στις διαδικασίες οξειδοαναγωγής έχουν ως αποτέλεσμα βλάβες σε βασικές κυτταρικές δομές, καθώς και σε πρωτεΐνες, λιπίδια αλλά και στο DNA, διαταράσσοντας έτσι την ομοιοστασία του οργανισμού και οδηγώντας σε μια ποικιλία ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων όπως την ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου [80].

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει επιγενετικό επαναπρογραμματισμό, συμπεριλαμβανομένης της υπερμεθυλίωσης του DNA και επομένως να οδηγήσει σε κακοήγη μετασχηματισμό, τοπική υποξία και διαφορές στην ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης της υποξίας στο ΝΚΚ, που μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν την οξειδωτική κατάσταση των νεοπλασματικών κυττάρων [81]. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο αυτά τα γεγονότα υπερμεθυλίωσης κατευθύνονται σε διακριτά CpG νησίδια στο γονιδίωμα είναι άγνωστος [81]. Τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες στο ΝΚΚ αντισταθμίζονται με εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και με τον τρόπο αυτό ενδεχομένως αποτρέπονται οι

ανοσολογικές αντιδράσεις, η απόπτωση, ή και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου που αξιοποιούνται από τα νεοπλασματικά κύτταρα για την επιβίωσή τους [82].

1.9.2 ROS (Reactive Oxygen Species)

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας [83].

Οι ελεύθερες ρίζες ROS είναι ένας συλλογικός όρος που αναφέρεται σε ασταθή, δραστικά, μερικώς μειωμένα παράγωγα οξυγόνου που δημιουργούνται ως υποπροϊόν των κανονικών μεταβολικών διεργασιών [84]. Οι ROS είναι μικρά μόρια και περιλαμβάνουν ρίζες οξυγόνου (υπεροξειδίο ($O_2 \cdot^-$), υδροξύλιο ($\cdot OH$), υπεροξύλιο ($RO_2 \cdot$) και αλκοξύλιο ($RO\cdot$)) και ορισμένα μη ριζικά που είναι είτε οξειδωτικοί παράγοντες είτε μετατρέπονται εύκολα σε ρίζες όπως υποχλωριούχο οξύ ($HOCl$), όζον (O_3), απλό οξυγόνο (1O_2) και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) [85], που μπορούν να οξειδώσουν εύκολα άλλα μόρια συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, αμινοξέων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων [86] [εικόνα 1.8].

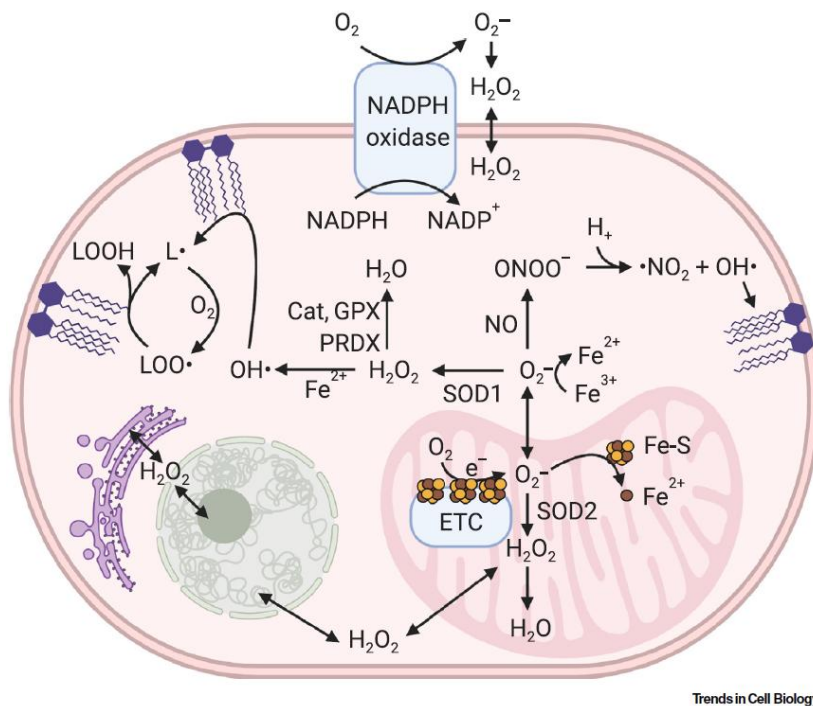
Οι ROS παράγονται μέσω μιας ποικιλίας εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων δράσεων [87]. Ενδοκυτταρικά, τα επίπεδα ROS μπορούν να τροποποιηθούν με μια ποικιλία κρίσιμων παραμέτρων όπως οξυγόνωση, διαθεσιμότητα γλυκόζης και παράγοντες ανάπτυξης [88].

Οι ROS παράγονται ενδογενώς από:

- μιτοχόνδρια (όπου το O_2 δρα ως τερματικός δέκτης ηλεκτρονίων για αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων) [89].
- Οξειδάση NADPH, ένα ένζυμο που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη [89] (είναι ενζυμικό σύστημα που παράγει ROS αντί να δημιουργεί ROS ως υποπροϊόν [85]).
- υπεροξώματα (που περιέχουν ένζυμα που παράγουν H_2O_2 π.χ. οξειδάση πολυαμίνης),
- ενδοπλασματικό δίκτυο (παράγει H_2O_2 ως υποπροϊόν κατά τη διάρκεια αναδίπλωσης πρωτεΐνης) [89].

Επίσης, ROS μπορούν να παραχθούν από εξωγενείς πηγές όπως οι ρύποι, ο καπνός, τα φάρμακα, τα ξενοβιοτικά, [85], η ιονίζουσα ακτινοβολία, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, οι περιβαλλοντικές προσβολές [89], και άλλοι μεσολαβητές [85] που επηρεάζουν τη λειτουργία κυτταρικών οργανυλλίων και ενζύμων [89]. Η ιονίζουσα ακτινοβολία παράγει ROS μέσω αλληλεπίδρασης με το νερό, το οποίο χάνει ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται διαδοχικά σε μια ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$), υπεροξειδίο υδρογόνου (H_2O_2), μια υπεροξειδική ρίζα (O_2^-), και τελικά οξυγόνο (O_2) [85].

Οι ROS παίζουν κεντρικό ρόλο στο κύτταρο ως δεύτερος αγγελιοφόρος στην ρύθμιση διαφόρων μορίων σηματοδότησης [87]. Ενεργούν ως ενοποιητές περιβαλλοντικών πληροφοριών καθώς και ως μεταγενέστεροι τελεστές των οδών σηματοδότησης [88].



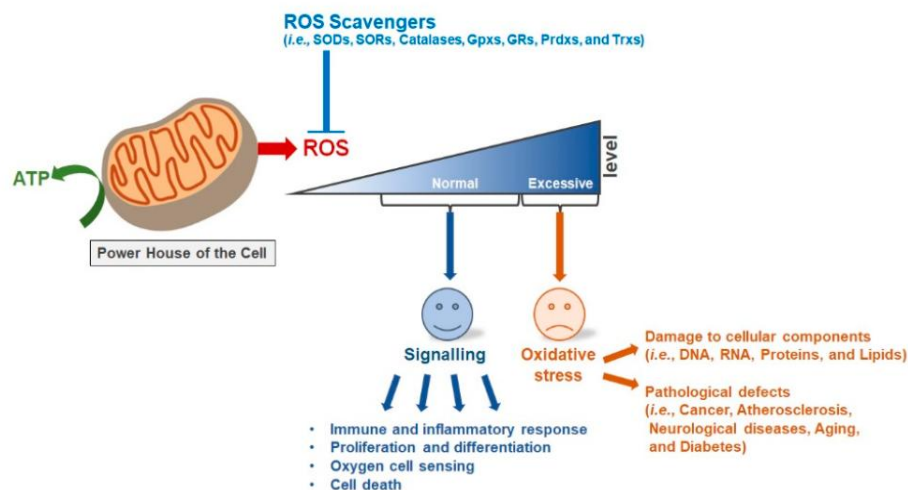
Εικόνα 1.8: Τύποι δραστικών μορφών οξυγόνου. Υπεροξειδίου (O_2^-) παράγεται εξωκυττάρια από NADPH οξειδάση ή ενδοκυτταρικά από μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). Στα μιτοχόνδρια, στοχεύει σε συμπλέγματα σιδήρου-θείου (Fe-S) απελευθερώνοντας σίδηρο (Fe^{2+}) και μειώνει σε τριθενή σιδηρούχο ιόν (Fe^{3+}) σε δισθενή σιδηρούχο ιόν (Fe^{2+}). O_2^- διασπάται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) από δυσμουτάσες του υπεροξειδίου ($SOD1$, $SOD2$). Το H_2O_2 διαχέεται μέσω μεμβρανών για να αντιδράσει με πρωτεΐνες και DNA και αποτοξινώνεται προς νερό με

κυτταρικές υπεροξειδάσες (καταλάση CAT, υπεροξειδάση γλουταθειόνης GPX, υπεροξυρεδοξίνες PRDX). O_2^- παράγει υπεροξυνοτρίτη ($ONOO^-$) μέσω μιας αντίδρασης με νιτρικό οξύ (NO). Η ρίζα υπεροξυλίου ($OH\bullet$) σχηματίζεται από αντίδραση H_2O_2 με Fe^{2+} και αποσύνθεση του $ONOO^-$ και ξεκινά τον καταρράκτη υπεροξειδωσής λιπιδίων. Πρώτον, $OH\bullet$ αντιδρά με λιπίδια για να σχηματίσει ρίζες λιπιδίων ($L\bullet$), οι οποίες αντιδρούν με το οξυγόνο για να σχηματίσουν ρίζες υπεροξειδίου των λιπιδίων ($LOO\bullet$). $LOO\bullet$ αντιδρά με λιπίδια για την αναμόρφωση $L\bullet$ συν υπεροξειδίου των λιπιδίων ($LOOH$) και ο κύκλος συνεχίζεται. Η υπερβολική υπεροξειδωσής των λιπιδίων οδηγεί σε φερρόπτωση[90].

Οι φυσιολογικές ποσότητες ROS είναι απαραίτητες για την φυσιολογική λειτουργία των ιστών, καθώς εμπλέκονται στην ρύθμιση διαφορετικών κυτταρικών οδών σηματοδότησης που επηρεάζουν διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) [91].

Σε συνθήκες ομοιοστασίας, τα κύτταρα προστατεύονται από την επιβλαβή επίδραση των ROS καθώς διαθέτουν ενζυματικά συστήματα υπεύθυνα για τη διάσπαση αυτών των εξαιρετικά δραστικών μορίων ή ακόμη και αντιοξειδωτικές ουσίες ικανές να απενεργοποιήσουν το υπερβολικό ROS και με τη σειρά τους να μειώσουν την τοξικότητα τους [86]. Αυξημένη παραγωγή ROS, διαταραχές στους μηχανισμούς απομάκρυνσής τους, ή ακόμα και η ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσουν σε συσσώρευση ROS με αποκορύφωμα το

οξειδωτικό στρες, μια κατάσταση ενός κυττάρου που χαρακτηρίζεται από την οξείδωση των βασικών βιομορίων [86]. Η ρύθμιση της ομοιόστασης ROS είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της υγείας των ανθρώπων [εικόνα 1.9] [92].



Εικόνα 1.9: Οι μιτοχονδριακές δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) καθαριστές και η ανάπτυξη του καρκίνου. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα εξαρτώνται από την παραγωγή ενέργειας των μιτοχονδρίων, και τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που παράγονται ως υποπροϊόντα κατά την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) από τα μιτοχόνδρια. Η ποσότητα των μιτοχονδριακών ROS εξισορροπείται από τους καθαριστές ROS στα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών ευκαρυωτικών κυττάρων και αυτά τα ROS ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η διαφοροποίηση ενεργώντας ως μόρια σηματοδότησης. Η απώλεια αυτής της συγκεκριμένης ισορροπίας μεταξύ ROS και ROS καθαριστών οδηγούν σε μια έκρηξη ανάπτυξης κυττάρων, με αποτέλεσμα την έναρξη και την ανάπτυξη καρκίνου [93].

Αν και οι ROS εμφανίζουν ευεργετικά αποτελέσματα ρυθμίζοντας την ενδοκυτταρική σηματοδότηση και την ομοιόσταση [85] εντούτοις σε χαμηλά επίπεδα, έχει αναφερθεί η συμβολή τους στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο νεοπλασματικό όγκο μέσω της δράσης τους ως μετατροπείς σήματος ή μέσω γονιδιωματικής βλάβης του DNA [93]. Τα χαμηλά επίπεδα ROS μπορεί να ενεργοποιήσουν τα κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου, και προωθούν το μεταβολισμό της γλυκόζης για τη διατήρηση της υψηλής κατανάλωσης ενέργειας των όγκων προκαλώντας μιτοχονδριακή αυτοφαγία, μεταβάλλοντας τα βασικά ένζυμα και γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης και σήματα ενεργοποίησης ενδοκυττάρων μονοπατιών. Οι λειτουργίες αυτές υποδηλώνουν το ρόλο των ROS στη διαδικασία της ογκογένεσης [92] μέσω της επίδρασης τους στις οδούς μεταγωγής σήματος, με συνεπακόλουθη γενετική αστάθεια αλλά και στην ενίσχυση της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων [82,83].

Από την άλλη πλευρά οι μαζικές συσσωρεύσεις ROS μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη του καρκίνου προκαλώντας σοβαρή οξειδωτική βλάβη βιομορίων, η οποία τελικά μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο [82] που προκαλείται από οξειδωτικό στρες [94].

Τα καρκινικά κύτταρα απαιτούν υψηλά επίπεδα ATP για τις ενεργειακές ανάγκες τους [95]. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτής της υπερβολικής παραγωγής ενέργειας είναι η συσσώρευση των ROS, που πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να εξασφαλιστεί η επιβίωση των κυττάρων [95]. Με σκοπό να εμποδισθούν οι πιθανές τοξικές επιδράσεις των ROS, πολλά ογκογόνα αυξάνουν επίσης την έκφραση του πυρηνικού παράγοντα NRF2, ο οποίος μειώνει τα επίπεδα ROS και διεγείρει την ογκογένεση [95].

Το υψηλό ποσοστό παραγωγής ROS αντισταθμίζεται από εξίσου υψηλό ποσοστό αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στα καρκινικά κύτταρα για τη διατήρηση της ισορροπίας της οξειδοαναγωγής [94]. Οι ROS έχουν αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν σημαντικές επιγενετικές διεργασίες όπως αυτές της μεθυλίωση DNA και της ακετυλίωσης ιστόνης. Στα καρκινικά κύτταρα, οι ROS ενισχύουν την μεθυλίωση του DNA προκαλώντας τη σίγαση του καταστολέα όγκου και των αντιοξειδωτικών γονιδίων και ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες [85]. Επομένως, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να ελέγχουν τα αυξημένα επίπεδα ROS, ειδικά κατά τα αρχικά στάδια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [93]. Σε καρκινικά κύτταρα με αυξημένα επίπεδα ROS, η ισορροπία της οξειδοαναγωγής διατηρεί εξίσου υψηλές ποσότητες αντιοξειδωτικών [93]. Αυτά τα αντιοξειδωτικά ελέγχουν τα επίπεδα ROS και αποτρέπουν τα κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από οξειδωτικό στρες [93].

Όπως προκύπτει από τη μελέτη της βιβλιογραφίας, στο NKK υπάρχουν αρκετές μελέτες που συσχετίζουν τις ROS όσο και αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων με τη νόσο και την εξέλιξή της ωστόσο ειδικά για το ΔNKK οι μελέτες είναι λίγες και με αντικρουόμενα αποτελέσματα [96]

1.9.3 Αντιοξειδωτικά

Το αντιοξειδωτικό είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ένζυμο ή συμπάργοντα που συμμετέχει στην εξάλειψη των ROS [90]. Οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και μονοπάτια αποτοξίνωσης που αποτελούνται από ενζυμικά και μη- ειδικά αντιοξειδωτικά τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από τις ROS κάτω από φυσιολογικές συνθήκες [97,98],

Η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του κυττάρου εξασφαλίζεται από το πολύπλοκο ενδογενές αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα

όπως υπεροξειδάση δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT) και υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPX) [99], αναγωγή γλουταθειόνης (GR) και υπεροξυρεδοξίνες (Prxs) [100], και μη ενζυμικές ενώσεις όπως γλουταθειόνη (GSH), πρωτεΐνες (φερρίτινη, τρανσφερίνη, σερουλοπλασμίνη, ακόμη και αλβουμίνη) [99] και χαμηλού μοριακού βάρους όπως ουρικό οξύ, συνένζυμοQ και λιποϊκό οξύ [99] [εικόνα 1.10].

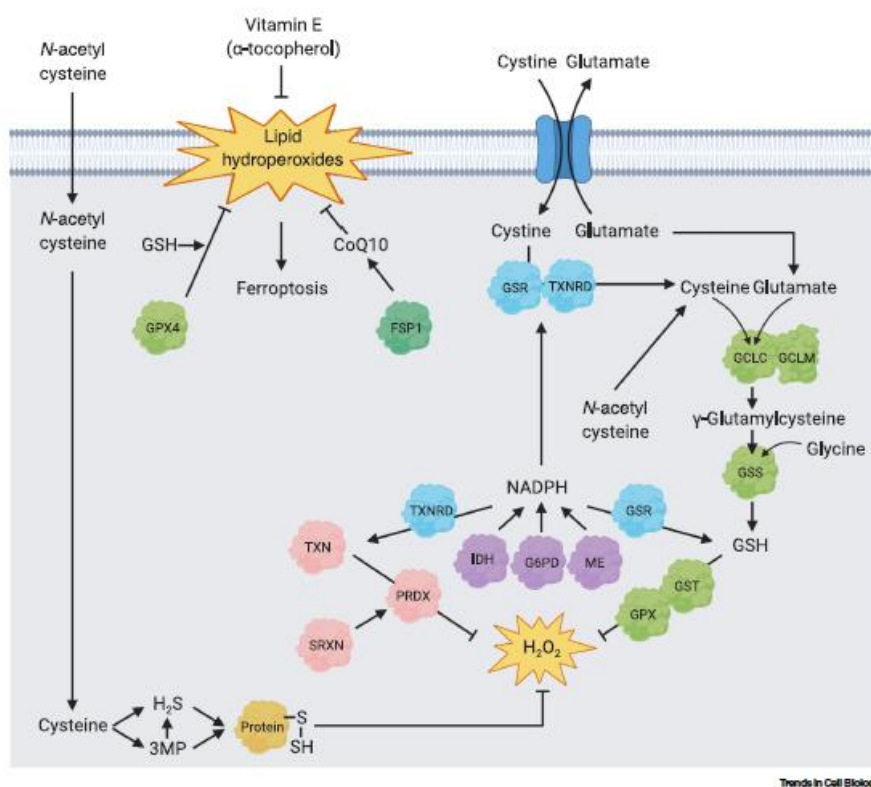
Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά, που ο οργανισμός προσλαμβάνει από την τροφή περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές βιταμίνες: βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), β-καροτένη (προβιταμίνη A), βιταμίνη A (ρετινόλη), βιταμίνη E (τοκοφερόλη), πολυφαινόλες [101] και ορισμένα μέταλλα (ZnMn, Cu, Se) [100] κ.α θεωρούνται ως κύρια εξωγενή αντιοξειδωτικά [99] ή διατροφικές αντιοξειδωτικές ουσίες [91]. Τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των ενδογενών, ωστόσο, τα ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά μπορεί να δράσουν συνεργικά για να διατηρήσουν ή να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση της οξειδοαναγωγής [100].

Αυτά τα ένζυμα περιλαμβάνουν υπεροξειδίο που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο δισμουτάσης (Cu/ZnSOD ονομάζεται επίσης SOD1), μαγγάνιο-εξαρτώμενο από υπεροξειδίο δισμουτάσης (MnSOD επίσης γνωστό ως SOD2), υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPX-Px) και καταλάση (CAT) [97]. Το υπεροξειδίο δισμουτάσης (SOD) καταλύει τη μετατροπή του O_2^- προς το H_2O_2 , το οποίο μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε νερό με καταλάση ή υπεροξειδάση γλουταθειόνης σε συνδυασμό με αναγωγή γλουταθειόνης (GR) [97]. Το σύστημα GSH λειτουργεί μέσω του ενζύμου υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GSH-Px), τα οποία απενεργοποιούν το H_2O_2 και άλλα υδροϋπεροξειδία (συμπεριλαμβανομένων των υπεροξειδίων αλκυλίων και λιπιδίων) από μετατροπή της GSH σε δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG), το οποίο μετατρέπεται ξανά σε GSH με αναγωγή γλουταθειόνης (GR) χρησιμοποιώντας το NADPH [97].

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα βρίσκονται σε μια ποικιλία τοποθεσιών και σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων [96]. Το μαγγάνιο της υπεροξειδάσης δισμουτάσης (MnSOD) βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, λαμβάνοντας υπόψη ότι το CuZnSOD βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, εντός των λυσοσωμάτων και επίσης στον πυρήνα [96]. Η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα υπεροξυσώματα, ενώ η υπεροξειδάση γλουταθειόνης μπορεί να βρεθεί σε όλα τα υποκυττάρια διαμερίσματα [96].

Οι αντιδράσεις μείωσης της οξείδωσης πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά προκειμένου να διατηρηθεί ένα φυσιολογικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό [79]. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες, τα ηλεκτρόνια απομακρύνονται, με μια αύξηση στην κατάσταση οξείδωσης και τα κύτταρα οξειδώνονται [79]. Ένα αντιοξειδωτικό, είναι ένας αναγωγικός παράγοντας, δίνοντας ηλεκτρόνια σε μια ελεύθερη ρίζα [79]. Η οξείδωση συνεπάγεται πάντα μια αντίστοιχη αντίδραση αναγωγής και από την άλλη πλευρά, η αντίδραση

αναγωγής χρειάζεται πάντα μια αντίδραση οξείδωσης: οι οξειδώσεις και οι αναγωγές πάντοτε συνδυάζονται και ονομάζονται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις [79]. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν ζευγάρια οξειδοαναγωγής, μεταξύ κυστεΐνης / κυστίνης, αναγωγικό η γλουταθειόνη (GSH) / οξειδωμένο δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG), αναγωγικό διουκλεοτίδιο νικοτιναμίδιο-αδενινο διουκλεοτίδιο (NAD) / οξειδωμένο νικοτιναμίδιο-αδενινο-διουκλεοτίδιο (NADH), αναγωγικό νικοτιναμίδιο-αδενινο φωσφορικό διουκλεοτίδιο (NADP) /οξειδωμένο νικοτιναδο-αδενινο φωσφορικό διουκλεοτίδιο (NADPH), φλαβινο-αδενινο-διουκλεοτίδιο (FAD) / οξειδωμένο φλαβινο-αδενινο-διουκλεοτίδιο (FADH₂) [79].



Εικόνα 1.10: Τύποι αντιοξειδωτικών. Η γλουταθειόνη (GSH) συντίθεται από κυστεΐνη, γλουταμικό και γλυκίνη σε αντίδραση δυο-σταδίων από καταλυτική γλουταμικό- κυστεΐνης λιγάση (GCLC), τροποποιητική (GCLM) υπομονάδα και GSH συνθετάση (GSS). Υπεροξειδάσες και τρανσφεράσες (GPX και GST) χρησιμοποιούν τη GSH ως συμπάραγοντα για την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Η θειορεδοξίνη (TXN) και η σουλφεριδοξίνη (SRXN) προάγουν την αποτοξίνωση μέσω H₂O₂ που προκαλείται από υπεροξειδεροξίνη (PRDX). Η αναγωγάση GSH (GSR) και η αναγωγάση TXN (TXNRD1) χρησιμοποιούν NADPH για την αναγέννηση GSH και TXN καθώς και για τη αναγωγή της εισαγόμενης κυστίνης σε κυστεΐνη. Το NADPH δημιουργείται μέσω πολλαπλών μεταβολικών ενζύμων (IDH1 / 2, G6PD, ME1). Τα λιπίδια υπεροξειδώνονται ελέγχονται από την εξαρτώμενη από GSH GPX4 και την ανεξάρτητη από GSH ουβικινόνη (CoQ10) με τον καταστολέα πρωτεΐνη 1 της φερρόπτωσης(FSP1). Εξωγενής χορήγηση της βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) ρυθμίζει τα υπεροξειδία των λιπιδίων. Η N-ακετυλο κυστεΐνη προάγει την παραγωγή GSH και την εξάλειψη ROS που εξαρτάται από το υπερθειδίδιο. [90].

Το αντιοξειδωτικό σύστημα των νεφρών βασίζεται σε μικρά μόρια κάθαρσης, όπως η γλουταθειόνη (GSH) και ένζυμα τα οποία τροποποιούν καταλυτικά τις ROS σε λιγότερο επιβλαβείς μορφές [102]. Το υπεροξειδίο δισμουτάσης (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPXs) είναι τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα [102]. Η γλουταθειόνη αναγωγάση (GR) και η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GST) εξαρτώνται από το ένζυμο γλουταθειόνη, τα οποία συμβάλλουν επιπλέον στην αντιοξειδωτική ικανότητα των νεφρών [102]. Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση που σχετίζεται με τον καρκίνο των νεφρών και μεσολαβείτε μέσω μείωσης της κυτταρικής αντιοξειδωτικής δεξαμενής [102]. Ο τροποποιημένος μεταβολισμός GSH συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη και εξέλιξη όλων των νεφρικών κακοηθειών αλλά θα μπορούσε, ταυτόχρονα, να είναι το κλειδί για πιθανές στοχευόμενες θεραπείες [82]. Ένα σημαντικό αυξημένο επίπεδο γλουταθειόνης (GSH) για την απομάκρυνση των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) έχει περιγραφεί στο ΝΚΚ [82].

Η γλουταθειόνη (GSH) θεωρείται το κυρίαρχο ενδογενές κυτταρικό αντιοξειδωτικό, παίζει κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική αμυντική απόκριση στο οξειδωτικό στρες εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές οξυγόνου [80]. Ειδικότερα, στο ΔΝΚΚ, το υπό όρους απαραίτητο αμινοξύ γλουταμίνη υποβάλλεται σε αναγωγική καρβοξυλίωση που οδηγεί στην παραγωγή του ογκομεταβολίτη 2HG καθώς και ως πρόδρομος για το κύριο αντιοξειδωτικό σύστημα που αποτελείται από GSH και GSSH [80]. Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι μεταβολίτες που τελικά συμβάλλουν στη βιοσύνθεση της GSH ήταν σε θέση να διαχωρίσουν σημαντικά ιστούς ΔΝΚΚ από τους φυσιολογικούς ιστούς, τονίζοντας τη σημασία αυτής της μεταβολικής οδού στο ΔΝΚΚ [80].

Στην οικογένεια των αντιοξειδωτικών ενζύμων, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ειδικά η GPX1, είναι ο συχνότερη μεταβολικός παράγοντας για τις ROS [103]. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η έκφραση των ενζύμων GPX παρουσιάζει διαταραχές σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων. Για παράδειγμα, έχει περιγραφεί υπερέκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο του μαστού, ενώ αρνητική ρύθμιση και απώλεια έκφρασης έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο παχέος εντέρου, στον καρκίνο του θυρεοειδούς και στον καρκίνο του στομάχου [103].

1.10 ΣΕΛΗΝΙΟ – ΣΕΛΗΝΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Οι ενώσεις σεληνίου (Se) θεωρούνται γενικά ως αντιοξειδωτικές [79]. Το σελήνιο είναι ένα βασικό μικροθρεπτικό συστατικό που εμπλέκεται στη ρύθμιση κυτταρικού μεταβολισμού και της σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνών [104]. Ως βασικό ιχνοστοιχείο για τα θηλαστικά, συχνά

χαρακτηρίζεται ως αντιοξειδωτικό, δεν είναι πραγματικό αντιοξειδωτικό από μόνο του, αλλά αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό των σεληνοπρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες εμπλέκονται στην προστασία των μακρομορίων και των κυττάρων κατά του οξειδωτικού στρες [105].

Στη φύση εμφανίζεται τόσο σε ανόργανες όσο και σε οργανικές μορφές [106]. Με οργανικές να είναι σεληνοκυστεΐνη, σεληνομεθειονίνη και σεληνογλουταθειονίνη [107]. Η κυρίαρχη μορφή σεληνίου στα τρόφιμα πιστεύεται ότι είναι η σεληνομεθειονίνη (SeMet) [108]. Η SeMet συντίθεται μόνο από φυτά, τόσο τα φυτά όσο και τα ζώα μπορούν να ενσωματώσουν αυτό το ασυνήθιστο αμινοξύ, μη ειδικά σε πρωτεΐνη που μιμείται το θειο-αμινοξύ μεθειονίνη [108]. Τα ζώα και ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να συνθέσουν τη Secys (σεληνοκυστεΐνη), η οποία ενσωματώνεται ειδικά σε έναν σχετικά μικρό αριθμό σεληνοπρωτεϊνών [108]. Επομένως, τα ζωικά προϊόντα συνήθως περιέχουν τόσο την SeMet στις περισσότερες πρωτεΐνες όσο και την SeCys σε σεληνοπρωτεΐνες [108].

Σχετικά χαμηλή πρόσληψη se καθορίζει την έκφραση των σεληνοενζύμων στα οποία χρησιμεύει ως βασικό συστατικό [108]. Αυξημένη πρόσληψη έχει αποδειχθεί ότι έχει αντικαρκινική δράση αν και η πολύ υψηλή πρόσληψη se μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις [108]. Η κατάσταση του σεληνίου έχει τέσσερις συνιστώσες : την εισαγωγή του Se, το se στους ιστούς, την απέκκριση se και την λειτουργία se [108].

Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στα νεφρά, το ήπαρ και το πάγκρεας, ακολουθούμενη από τον καρδιακό και σκελετικό μυ [108], ενώ τα επίπεδα σεληνίου στο λιπώδη ιστό βρέθηκαν να είναι πολύ χαμηλότερα [109].

Για τον άνθρωπο, υπάρχουν κάποια δεδομένα σχετικά με τις επιπτώσεις των επιπέδων se στη γήρανση [110]. Οι συγκεντρώσεις κυκλοφορούντος se πέφτουν ελαφρώς ή παραμένουν σταθερές με την ηλικία [110]. Ωστόσο, η κατανομή στους ιστούς μπορεί να αλλάξει [110]. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα γηράσκοντα κύτταρα συσσωρεύουν οξειδωτική βλάβη [110] τόσο στο μιτοχondριακό όσο και στο πυρηνικό DNA [110]. Τα μιτοχόνδρια συσσωρεύουν βλάβες που σχετίζονται με την ηλικία, απελευθερώνοντας περισσότερες δραστικές μορφές οξυγόνου [110]. Έτσι, οι GPXs και άλλες σεληνοπρωτεΐνες μπορεί να παίζουν ρόλο στην επιβράδυνση της κυτταρικής βλάβης και της διαδικασίας γήρανσης [110]. Το μήκος των τελομερών μειώνεται με την ηλικία στα περιφερικά λευκοκύτταρα και αυτό επιταχύνεται από το οξειδωτικό στρες στους ινοβλάστες [110]. Ο ρυθμός συντόμευσης τελομερών και συσσώρευση καρβονυλομάδας συσχετίστηκε αντιστρόφως με τη δραστηριότητα GPX σε ινοβλάστες [110]. Ως βασικό συστατικό των σεληνοπρωτεϊνών, το se εκτελεί δομικούς και ενζυμικούς ρόλους [111]. Μπορεί να είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη ότι οι ενώσεις Se μπορεί να έχουν διπλό ρόλο, είτε ως αντιοξειδωτικό είτε ως προ-οξειδωτικό [79]. Επίσης, οι

ενώσεις Se μπορεί να έχουν διπλό ρόλο στην αγγειογένεση που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες, είτε ως προ- αγγειογένεση είτε ως αντι-αγγειογένεση [79].

Το σελήνιο είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο στον άνθρωπο, που είναι παρόν σε πρωτεΐνες με τη μορφή του 21^{00} πρωτεϊνογενικού (proteinogenic) αμινοξέος, σεληνοκυστεΐνη (Sec) [112]. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, βρίσκονται είκοσι πέντε γονίδια σεληνοπρωτεΐνης το κωδικόνιο UGA προσδιορίζει την εισαγωγή σεληνοκυστεΐνης [113]. Η Sec ενσωματώνεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα κατά τη μετάφραση της σεληνοπρωτεΐνης στο συγκεκριμένο κωδικόνιο UGA [114]. Το κωδικόνιο UGA συνήθως σηματοδοτεί το τερματισμό της μετάφρασης και συνεπώς, ενσωμάτωση της Sec στην πεπτιδική αλυσίδα απαιτεί την κωδικοποίηση του UGA από κωδικόνιο τερματισμού σε Sec [114]. Αυτή η κωδικοποίηση επιτυγχάνεται με την παρουσία α) stem-loop δομής εντός της 3'αμετάφραστης περιοχής της σεληνοπρωτεΐνης του mRNA, β) αρκετές πρωτεΐνες που συνδέονται με τη δομή SECIS (selenocysteine inserting sequence, αλληλουχία εισαγωγής σεληνοκυστεΐνης) και γ) μια ειδική σεληνοκυστεΐνη- tRNA (tRNA- Sec) που φέρει το αμινοξύ sec και συντίθεται από σεληνίδη, ATP και seryl-tRNA [114]. Όλες οι σεληνοπρωτεΐνες περιέχουν μια sec που βρίσκεται στη ενεργή θέση της πρωτεΐνης, εκτός από την σεληνοπρωτεΐνη P [114].

Σεληνοπρωτεΐνικα ένζυμα με γνωστές λειτουργίες ορίζονται σύμφωνα με αυτές τους τις λειτουργίες: TXNRD1, TXNRD2, TXNRD3 (αναγωγάσες θειορεδοξίνης), GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX6 (υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης), DIO1, DIO2, DIO3 (ιωδοθυρονίνη δειωδινάσες), MSRB1 (σουλφοξειδίο της μεθειονίνης αναγωγή B1) και SEPHS2 (σεληνοφωσφορική συνθετάση 2) [112].

Έχει αποδειχθεί ότι για τη διαμόρφωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των GPXs σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, η σεληνοκυστεΐνη, προερχόμενη από σεληνομεθειονίνη μετά από ειδικές αντιδράσεις [following B6-dependent-transsulfuration reactions] μετατρέπεται σε σεληνίδη και επανασυντίθεται σε μια ομάδα σεληνο-κυστεΐνυλίου που ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση και ενεργοποίηση του συστήματος των GPXs [111]. Αντίθετα, η μεταβολική οδός του ανόργανου se παρακάμπτει τη διαδικασία των ειδικών B6 αντιδράσεων προκειμένου να ενεργοποιηθεί το σύστημα GPX [111].

Οι σεληνοπρωτεΐνες δεν εφοδιάζονται όλες το ίδιο με το Se [115]. Επίσης, οι σεληνοπρωτεΐνες δεν ανταποκρίνονται εξίσου στη διαθεσιμότητα σεληνίου [116]. Διαφορετικά μέλη των GPXs αποκρίνονται διαφορετικά στην ανεπάρκεια σεληνίου, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «ιεραρχία των σεληνοπρωτεϊνών» [117], αυτή η ιεραρχία περιγράφεται ως εξής GPX2>GPX4>>GPX3=GPX1 καθιερωμένη στην κυτταρική καλλιέργεια [115] (ή GI-GPX>PHGPX>cGPX=pGPX, αυτό το φαινόμενο μελετήθηκε αμοιβαία συνδυάζοντας τις περιοχές κωδικοποίησης των GI-GPX, PHGPX, cGPX με τα 3' UTRs τους [118]. Αυτό σημαίνει

ότι μετά την στέρηση σεληνίου, ορισμένες πρωτεΐνες μειώνονται γρήγορα (χαμηλή κατάταξη), ενώ άλλες συνεχίζουν να συντίθενται ακόμη και σε χαμηλό επίπεδα διαθεσιμότητας (υψηλή κατάταξη) [115,117]. Η μείωση των επιπέδων mRNA αντανάκλα την απώλεια δραστηριότητας και περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ασταθών σεληνοπρωτεϊνών, που δείχνει ότι η σταθερότητα του mRNA μπορεί να καθορίσει την κατάταξη των σεληνοπρωτεϊνών στην ιεραρχία [118]. Οι RNA πρωτεΐνες χαμηλής κατάταξης υποβαθμίζονται γρήγορα σε ανεπάρκεια Se, λαμβάνοντας υπόψη ότι το RNA υψηλής κατάταξης παραμένει σταθερό, επιτρέποντας μια ταχύτερη επανασύνθεση κατά τη διαθεσιμότητα του Se [115]. Φαίνεται εύλογο να αναφέρεται ότι αυτές που ανταποκρίνονται αργά μπορεί να έχουν πιο ζωτικές λειτουργίες από της σεληνοπρωτεΐνες που έχουν πιο γρήγορη ανταπόκριση [116]. Στην πραγματικότητα, οι GPx1–4 διαφέρουν μεταξύ τους σε σχέση με την κατάταξή τους στην ιεραρχία των σεληνοπρωτεϊνών, των ιστών, του υποκυττάρου εντοπισμού, την ειδικότητα υποστρώματος, και της μεταγραφικής ρύθμισης, οι οποίες συλλογικά επισημαίνουν διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους [115]. Η έκφραση του mRNA της GPX1 πρωτεΐνης και η δραστηριότητάς της στους ιστούς είναι πιο ευαίσθητη από άλλες σεληνοϋπεροξειδάσες ή σεληνοπρωτεΐνες [117]. Η ιεραρχία της βιοσύνθεσης σεληνοπρωτεΐνης δεν είναι πλήρως γνωστή [118].

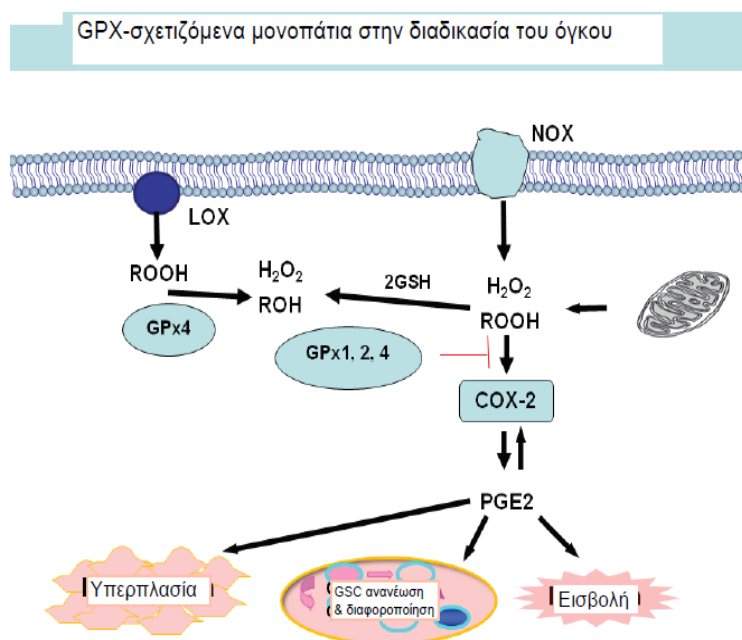
Η GPX1 και η GPX2 έχουν αντιοξειδωτικές λειτουργίες προστασίας των κυττάρων από δραστικές μορφές οξυγόνου, δραστικές μορφές αζώτου, και οξειδωτική βλάβη [114]. Οι βιοχημικές και κυτταρικές επιδράσεις του σεληνίου επιτυγχάνονται μέσω δραστηριότητας των σεληνοπρωτεϊνών που περιέχουν σεληνοκυστεΐνες [105].

Μια διατροφική ανεπάρκεια που σχετίζεται με μείωση της συστηματικής έκφρασης σεληνοπρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα οξειδωτικό στρες και ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες [106]. Μια μελέτη διαπίστωσε ότι η χαμηλή πρόσληψη σεληνίου αυξάνει τον κίνδυνο για ΝΚΚ [104]. Το σελήνιο είναι γνωστό ως αντικαρκινική ουσία [104]. Η βιοσύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα se και οι σεληνοπρωτεΐνες εμπλέκονται σε πολλά μονοπάτια που μπορούν να επηρεάσουν την καρκινογένεση [114]. Η βιοσύνθεση και η δραστηριότητα των σεληνοπρωτεϊνών ρυθμίζεται αυστηρά σε διαφοροποιημένα κύτταρα [105]. Αντίθετα, η απορρύθμιση των σεληνοπρωτεϊνών μπορεί να συμβάλει στην παθογένεση των ασθενειών που σχετίζονται με κυτταρική διαφοροποίηση και από-διαφοροποίηση, όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης [105].

1.11 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

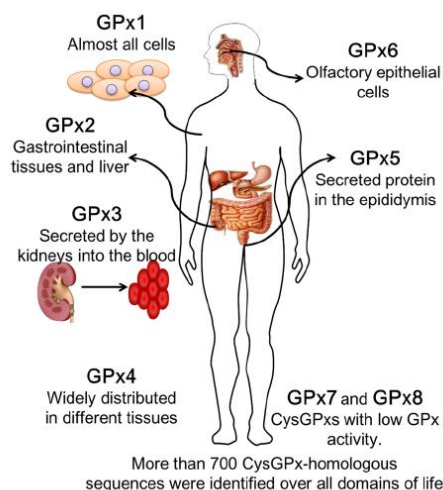
Το σύστημα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανήκει σε μια οικογένεια ενζύμων που σχετίζεται φυλογενετικά και παίρνει μέρος σε αρκετές σημαντικές βιολογικές διαδικασίες [119]. Η GPX μπορεί να καταλύσει την μείωση του H_2O_2 και να οδηγήσει σε οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH), η οποία μπορεί να μειωθεί από την αναγωγή της GSH μέσω NADPH [119]. Η οικογένεια υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα σημαντικό μέλος του αντιοξειδωτικού συστήματος που μεταβολίζει τις ενδοκυτταρικές ROS και διατηρεί την ομοιόσταση των κυττάρων [103]. Αυτά τα ένζυμα προστατεύουν τη δομή και τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης από οξειδωτική βλάβη [92]. Έχουν σημαντικό ρόλο στα διαφορετικά στάδια καρκινογένεσης [120] [εικόνα 1.11].

Η οικογένεια των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης (GPXS) αποτελείται από οκτώ μέλη (GPX1-8) στα θηλαστικά [εικόνα 1.12], πέντε από τα οποία είναι σεληνοπρωτεΐνες στον άνθρωπο (GPX1-4 και 6). Οι άλλες τρεις ισομορφές περιέχουν κυστεΐνη αντί για σεληνοκυστεΐνη [121].



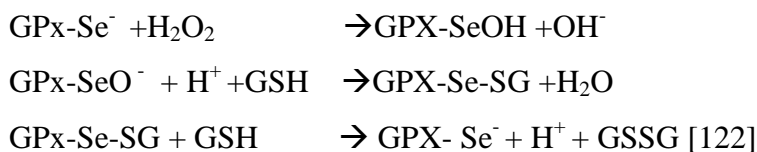
Εικόνα 1.11: Δραστηριότητα GPXs και COX/LOX. Τα μιτοχόνδρια και οι οξειδάσες NADPH (NOX) είναι ενδοκυτταρικές πηγές H_2O_2 ή άλλων υδροϋπεροξειδίων (ROOH). Το H_2O_2 και ROOH μειώνονται από όλα τα GPX1,2 και 4 και επίσης από GPX3. Τα υδροϋπεροξειδία ενεργοποιούν το COX-2, το οποίο κατ'αρχήν, αναστέλλεται από όλες τις GPXs, κατά προτίμηση από την GPX4. Το COX-2 σχηματίζει PGE₂, το οποίο σε μια αυτοκρινή

αγκύλη μπορεί να προκαλέσει την έκφραση του COX-2 για περαιτέρω αύξηση της παραγωγής PGE₂ για την προώθηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της εισβολής, της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης των CSC (cancer stem cells) [120.]



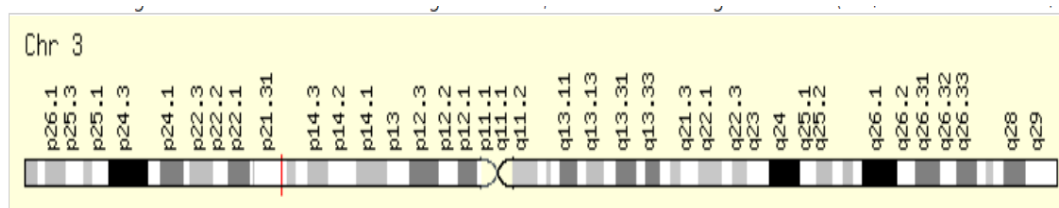
Εικόνα 1.12: Η κύρια κατανομή των GPXs στον άνθρωπο [92].

Οι λειτουργίες των περισσότερων δεν είναι πλήρως γνωστές, αλλά όλες μπορούν να μειώσουν τα υδροϋπεροξειδία: $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ [120]. Έτσι, μια κοινή λειτουργία των GPXs σχετίζεται με το μεταβολισμό των υδροϋπεροξειδίων [120]. Από μηχανιστική άποψη η σεληνόλη (-SeH) στις SecGPXs αντιδρά με τη μορφή σεληνολικού με H_2O_2 σε σεληνενικό όξύ (-SeOH) το οποίο ανάγεται πίσω στο SeH κατά 2GSH σχηματίζοντας GSSG και νερό [122].



1.11.1 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1 [GPX1, GPXD, GSHPX1]

Η GPX1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p21.31 [εικόνα 1.13] [123] και αποτελείται από δυο εξόνια σε μια περιοχή 1,42kb [124]. Μέγεθος 203 αμινοξέων και μοριακή μάζα 22088Da και στην τεταρτοταγή δομή είναι ομοτετρομερές [123].

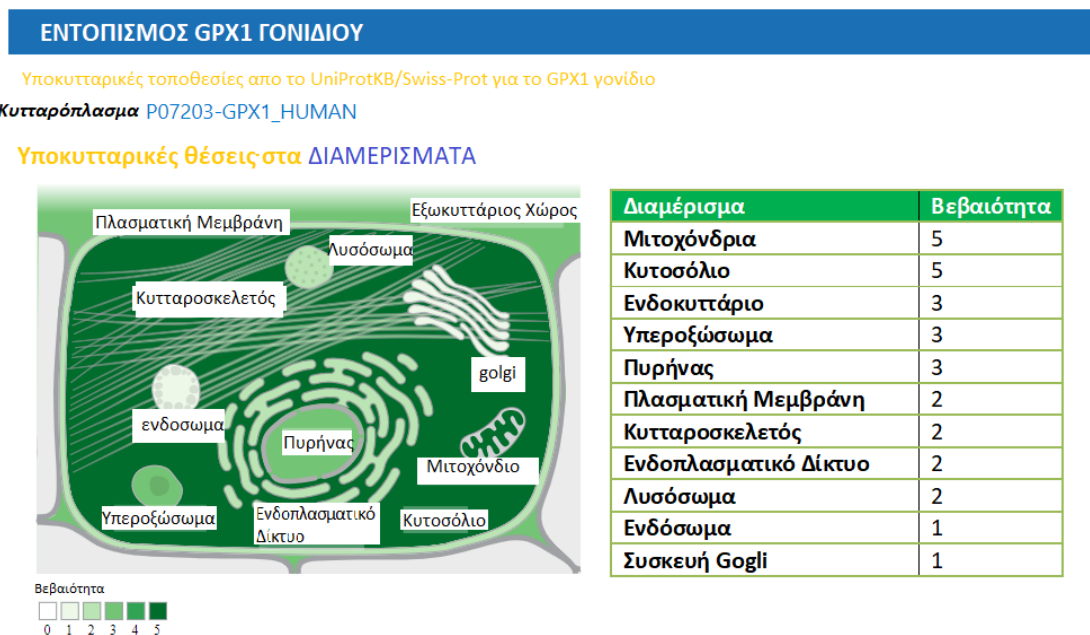


Εικόνα 1.13 : Χρωμόσωμα 3 όπου με κόκκινη γραμμή εμφανίζεται η θέση της GPX1 πρωτεΐνης [123]

Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης GPX1 είναι η αποτοξίνωση υδροϋπεροξειδίων [125]. Δεν είναι δυνατή η αντικατάσταση της GPX1 από οποιαδήποτε άλλη σελινοπρωτεΐνη στην προστασία από το γενικευμένο οξειδωτικό στρες [125]. Θεωρείται ένα ένζυμο που αλληλεπιδρά με το οξειδωτικό στρες [119], είναι ένα από τα πιο κρίσιμα μέλη της οικογένειας GPXS που μειώνει καταλυτικά το υπεροξείδιο του υδρογόνου στην παραγωγή νερού [126].

Η GPX1 είναι ένα άκρως εκφραζόμενο μέλος της οικογένειας των GPXS, είναι μια ευρέως κατανεμημένη ενδοκυτταρική πρωτεΐνη που εμφανίζεται σε όλα τα κύτταρα [119]. Είναι διασκορπισμένη στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια [εικόνα 1.14] [126] και αντιπροσωπεύει το κύριο αντιοξειδωτικό ένζυμο της οικογένειας GPX [98]. Η διαφορετική έκφραση GPX1 συσχετίζεται στενά με την καρκινογένεση και την εξέλιξη της νόσου [119].

Η έκφραση GPX1 έχει συσχετισθεί με την καρκινογένεση σε αρκετούς κακοήθεις όγκους [119]. Είναι ενδιαφέρον επίσης ότι ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν τον πιθανό ανασταλτικό ρόλο της GPX1 στην καρκινογένεση στη φάση έναρξης λόγω της ικανότητας μείωσης των οξειδωτικών μεταλλάξεων DNA [119]. Η GPX1 είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που συμβάλει στην παρεμπόδιση της επιβλαβούς συσσώρευσης ενδοκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου [120]. Η κύρια λειτουργία της GPX1 είναι να προστατεύει τα κύτταρα από ροές H₂O₂ καθώς και από οργανικά υδροϋπεροξειδία [127]. Η GPX1 μπορεί να αποτρέψει τις μεταλλάξεις του DNA λόγω του οξειδωτικού στρες και να εξουδετερώσει επίσης την παραγωγή μεσολαβητών που προέρχονται από φλεγμονώδεις διαδικασίες (COX/LOX [κυκλοοξυγενάση/ λιποξυγενάση] [125].



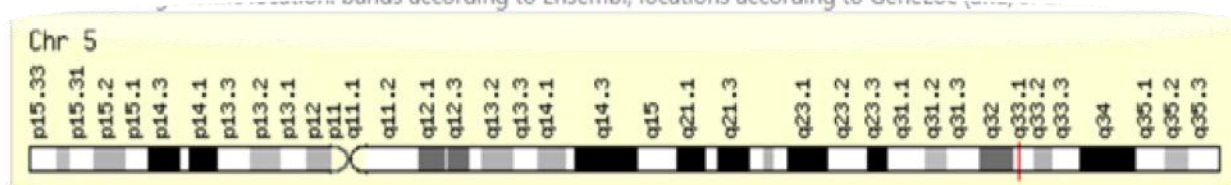
Εικόνα 1.14: Υποκυτταρική εντόπιση της GPX1, με πίνακα όπου εμφανίζει σε πιο οργανύλλιο υπάρχει πιο έντονα [123].

1.11.2 GPX2

Εκφράζεται κυρίως στη γαστρεντερική οδό και στο ήπαρ του ανθρώπου, εντοπίζεται στο κυτόπλασμα, και της οποίας το προτεινόμενο υπόστρωμα είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η υπερέκφραση αυτού του γονιδίου σχετίζεται με αυξημένη διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτό το ισοένζυμο είναι επίσης μια σεληνοπρωτεΐνη, που περιέχει το σπάνιο αμινοξύ σεληνοκυστεΐνη (Sec) στην δραστική του θέση [128]. Το γονίδιο GPX2 μπορεί να αντισταθμίσει την έλλειψη έκφρασης του GPX1 γονιδίου στο επιθήλιο του ειλεού [120].

1.11.3 GPX3 [GPx-P, GSHPx-3, GSHPx-P]

Η GPX3 βρίσκεται στο 5q33.1 [εικόνα 1.15] με μέγεθος 8,555 βάσεων και 226 αμινοξέων, μοριακής μάζας 25552Da και στην τεταρτοταγή της δομή είναι ομοτετραμερές [129], επίσης περιέχει 6 εξόνια [130]. Είναι το μόνο γνωστό εξωκυττάριο γλυκοζυλιωμένο ένζυμο των GPXs που μπορεί να χρησιμοποιήσει θειορεδοξίνη, γλουταρεδοξίνη και γλουταθειόνη ως δότες ηλεκτρονίων, για τη μείωση του ευρέος φάσματος υδροϋπεροξειδίων [131].



Εικόνα 1.15: Χρωμόσωμα 5 στο οποίο σημειώνεται με κόκκινη γραμμή η τοποθεσία της GPX3 πρωτεΐνης[129]

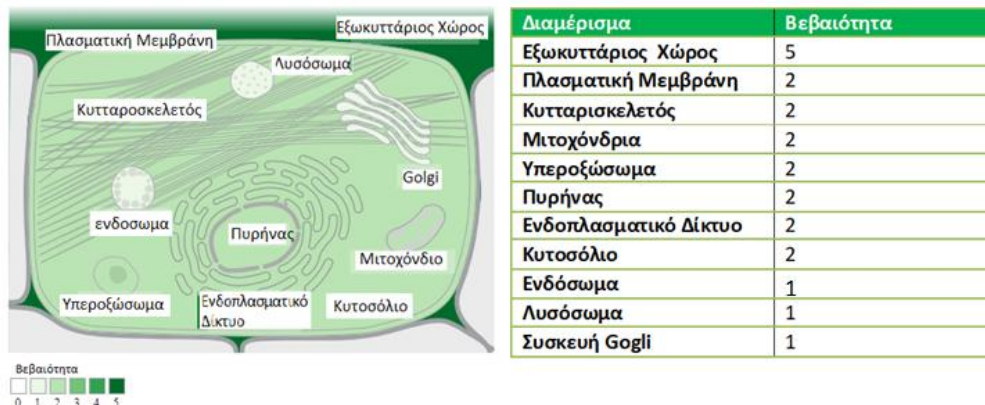
Η GPX3 συντίθεται κυρίως στα εγγύς σωληνάρια του νεφρού [132]. Αν και η κύρια πηγή του GPX3 είναι ο νεφρός, η GPX3 δεν είναι ανιχνεύσιμη στο καρκίνωμα των νεφρικών κυττάρων στις ελάχιστες αναφορές της τρέχουσας βιβλιογραφίας [132]. Ως εξωκυττάριο ένζυμο ανιχνεύεται σε εξωκυτταρικά σωματικά υγρά όπως πλάσμα αίματος, δάκρυ, κολλοειδές αυλό θυρεοειδούς ή αμνιακό υγρό [εικόνα 1.16] [132]. Αυξημένα επίπεδα GPX3 θεωρείται ότι προκύπτουν από μεταγραφική αναπροσαρμογή λόγω οξειδωτικού στρες [132].

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ GPX3 ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Υποκυτταρικές τοποθεσίες από το UniProtKB/Swiss-Prot για το GPX3 γονίδιο

Εκκρίνεται P22352-GPX3_HUMAN

Υποκυτταρικές θέσεις στα ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΑ



Εικόνα 1.16: Υποκυτταρική εντόπιση της GPX1, με πίνακα όπου εμφανίζει σε πιο οργανύλλιο υπάρχει πιο έντονα [129]

Η έκφραση μπορεί να αποδίδεται στο οξειδωτικό στρες που παράγεται από το μεταβολισμό των λιποκυττάρων [132]. Η GPX3 συνήθως ρυθμίζεται προς τα κάτω σε καρκινώματα [132]. Η δραστηριότητα της ήταν σημαντικά μειωμένη στο αίμα των ασθενών με καρκίνο μαστού, καρκίνο στομάχου και καρκίνο παχέος εντέρου [132]. Η GPX3 εκφράζεται πάντα έντονα στους αντίστοιχους υγιείς ιστούς, και έχει θεωρηθεί ότι εμφανίζει ογκοκατασταλτική δραστηριότητα [132]. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι η υπερμεθυλίωση του γονιδίου GPX3 [132]. Έχει προταθεί ότι η λειτουργία της GPX3 είναι πιθανώς πέρα από εκείνη ενός ενζύμου αποτοξίνωσης [132]. Αντ' αυτού, μπορεί να ρυθμίσει άμεσα ή έμμεσα την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [132]. Η αναστολή της έκφρασης της GPX3 και ως συνέπεια, της δραστηριότητας της GPX3 πρωτεΐνης, μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της έναρξης της νεοπλασίας, της νεοπλασματικής αύξησης και της μετάστασης [125].

1.11.4 GPX4

Το GPX4 είναι ένα μονομέρες [132], με τρεις ισομορφές τη μιτοχονδριακή, την πυρηνική και την κυτοσολική [133]. Η ικανότητα της GPX4 να μειώνει τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδικών μεμβρανών μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταροπροστασία [132]. Η GPX4 είναι ένας ρυθμιστής της φερρόπτωσης (εξαρτώμενος από σίδηρο, μη αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος), που ενεργεί μέσω της καταστολής της παραγωγής υπεροξειδωσής λιπιδίων, η αναστολή του μονοπατιού της υπεροξειδάσης λιπιδίων μπορεί να προστατεύει έναντι της

φερρόπτωσης που θα μπορούσε να καταστήσει τα ανθεκτικά στη θεραπεία καρκινικά κύτταρα δεκτικά σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (φερόπτωση) [134].

Ωστόσο, ορισμένα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι της φερρόπτωσης [134]. Αυτό το ισοένζυμο έχει υψηλή προτίμηση για λιπίδια υδροϋπεροξειδάσης και προστατεύει τα κύτταρα ενάντια στην υπεροξειδωση των λιπιδίων μεμβράνης και τον κυτταρικό θάνατο [135], καθώς είναι απαραίτητο για τον τερματισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων [127]. Απαιτείται επίσης για τη φυσιολογική ανάπτυξη του σπέρματος. Έτσι, έχει αναγνωριστεί ως πρωτεΐνη «σεληνόφωτο» λόγω της ικανότητας της να εξυπηρετεί διπλές λειτουργίες ως υπεροξειδάση, καθώς και ως δομική πρωτεΐνη στα ώριμα σπερματοζώαρια [135].

1.11.5 GPX5

Εκφράζεται ειδικά στην επιδιδυμίδα της αρσενικής αναπαραγωγικής οδού των θηλαστικών και ρυθμίζεται από ανδρογόνα. Σε αντίθεση με πολλές άλλες χαρακτηριστικές υπεροξειδάσες γλουταθειόνης, αυτό το ένζυμο δεν είναι σεληνοπρωτεΐνη, χωρίς το υπόλειμμα σεληνοκυστεΐνης. Έτσι, είναι ανεξάρτητο από το σελήνιο και έχει προταθεί να παίζει ρόλο στην προστασία των μεμβρανών των σπερματοζωαρίων από τις βλαβερές επιδράσεις των υπεροξειδίων των λιπιδίων και/ή την πρόληψη της πρόωρης αντίδρασης των ακροσωμάτων. Εναλλακτικά, έχουν βρεθεί συνδεδεμένες μεταγραφικές παραλλαγές για αυτό το γονίδιο [136].

1.11.6 GPX6

Η GPX6 είναι μια σεληνοκυστεΐνη σχετική με την GPX3 [137]. Η έκφραση του γονιδίου έχει παρατηρηθεί σε έμβρυα και οσφρητικό επιθήλιο [138].

1.11.7 GPX7

Η GPX7 είναι ένα πρόσφατα αναγνωρισμένο μέλος της οικογένειας GPX, με βάση τη δομική ομολογία, με άγνωστες βιολογικές λειτουργίες [139]. Η GPX7 έχει αποδειχθεί ότι έχει πολύ περιορισμένη δραστηριότητα ενζύμου GPX λόγω της έλλειψης σεληνοκυστεΐνης που δεσμεύει γλουταθειόνη. Μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται από το μεταβολισμό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Μπορεί επίσης να εξουδετερώσει το υπεροξειδίο του υδρογόνου *in vitro* απουσία γλουταθειόνης και να προστατεύσει τα φυσιολογικά οισοφαγικά

επιθήλια από οξειδωτικό στρες που προκαλείται από όξινα χολικά άλατα, οξειδωτική βλάβη και τη θραύση του διπλού κλώνου DNA [140].

1.11.8 GPX8

Η υπεροξειδάση γλουταθειόνης 8 είναι μια πρωτεΐνη, που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και εισάγει δισουλφιδικούς δεσμούς σε νεοσυσταθείσες πρωτεΐνες μέσω πρωτεΐνης δισουλφιδίου ισομεράσης (PDI). Πρόκειται για μια PDI υπεροξειδάση που μειώνει την περιεκτικότητα σε H₂O₂ και το οξειδωτικό στρες σε θέσεις που έχουν έκτακτη ανάγκη [137]. Παρουσία υπεροξειδίου, οι GPX7 και GPX8 αλληλεπιδρούν με οξείδωση για την αναδίπλωση πρωτεϊνών που σχηματίζουν δισουλφίδιο [137].

1.12 Υπεροξειδάσες γλουταθειόνης 1 και 3 σε επιθηλιακά νεοπλάσματα

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μεταβολές στα επίπεδα των GPXs σε διάφορους τύπους νεοπλασματικών όγκων [120]. Εντούτοις, ο ρόλος των διαφορετικών πρωτεϊνών GPXs στην διάγνωση και στην πρόγνωση καρκινωμάτων δεν έχει πλήρως αποκρυσταλλωθεί. Παρακάτω αναφέρονται περιπτώσεις συνήθων όγκων και επιχειρείται μία σύντομη ανασκόπηση σχετικά με την έκφραση των GPX πρωτεϊνών σε αυτούς [92] [Πίνακας 1.6].

1.12.1 GPX1 σε επιθηλιακά νεοπλάσματα

Η GPX1 προλαμβάνει της μεταλλάξεις οξείδωσης του DNA, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη των όγκων, και έρευνες δείχνουν ότι η υπερέκφραση της GPX1 μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη του όγκου, [92], που υποδηλώνει προστατευτικό ρόλο κατά την ογκογένεση [120]. Ωστόσο, η έκφραση της GPX1 έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζεται αρνητικά στον καρκίνο θυρεοειδούς, στον καρκίνο παχέος εντέρου, και γαστρικό καρκίνο [92], και αντίθετα ότι παίζει ογκογόνο ρόλο στον καρκίνο των νεφρών, στον καρκίνο του παγκρέατος και στον καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα [92].

Ο ρόλος της GPX1 στα πλακώδη κύτταρα του λάρυγγα παραμένει άγνωστος [124]. Η μελέτη των Qicheng Zhang et.al. με ανοσοϊστοχημική μέθοδο έδειξε μόνο κυτταροπλασματική χρώση, με την υπερέκφραση να είναι σημαντικά υψηλότερη σε καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με τα

φυσιολογικά χειρουργικά όρια, και να συσχετίζεται με λεμφαδενική μετάσταση και με το στάδιο TNM. Με συμπέρασμα, η GPX1 μπορεί να εφαρμοστεί για την πρόβλεψη της πρόγνωσης σε ασθενείς με LSCC (πλακώδες κυτταρικό καρκίνωμα του λάρυγγα) και ότι η αυξημένη έκφραση επιπέδων GPX1 συσχετίζεται με κακή λειτουργικότητα σε ασθενείς με LSCC [124].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το νιτροξειδωτικό στρες και το γλυκοξειδικό στρες της GPX μπορεί να απενεργοποιηθεί. Τα αποτελέσματα της μελέτης των Sun Young Min et al δείχνουν ότι η απενεργοποίηση της GPX1 συνδέεται με μεθυλίωση στον καρκίνο του στομάχου. Υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικής έκφρασης της GPX1 και της GPX3 έχουν ανιχνευθεί σε φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, με ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία. Στον γαστρικό καρκίνο αντίθετα έχει παρατηρηθεί απώλεια της έκφρασης της GPX1 σε ποσοστό 24,4%, και της GPX3 στο 30,7% των περιπτώσεων [141].

Οι Yagublu et al έχουν δείξει πως στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου παρατηρείται ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση των GPX1 και GPX4 σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου. Σε άλλη μελέτη οι Murawaki et. al. στην οποία έδειξαν ότι το επίπεδο της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της GPX1 σε καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου ήταν χαμηλότερος από ότι στους φυσιολογικούς ιστούς [142].

Από τη μελέτη των Jae Ryung Lee et.al με ανοσοϊστοχημική μέθοδο σε πλακώδες καρκίνωμα του στόματος φάνηκε πως η υπερέκφραση της GPX1 σχετίζεται με δυσμενείς κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως προχωρημένο στάδιο του όγκου, μεγάλο μέγεθος όγκου και βάθος διήθησης, που συνήθως υποδηλώνουν προχωρημένη νόσο [143].

1.12.2 GPX3 σε επιθηλιακά νεοπλάσματα

Η GPX3 θεωρείται ως ένα νέο γονίδιο καταστολής όγκων, και η υπερμεθυλίωση, η οποία σχετίζεται με μείωση της GPX3, σε ασθενείς με οισοφάγο Barrett, αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου και καρκίνο του προστάτη [92], καθώς και η μειωμένη ρύθμιση αυτής γενικά συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση [120]. Η GPX3 έχει προστατευτικό αντιοξειδωτικό ρόλο για τα εγγύς νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα σε ασθενείς με νεφρική νόσο [137].

Στη ανοσοϊστοχημική μελέτη των Youbin Lin et.al [144] αξιολογήθηκε σε καρκίνο του οισοφάγου τη έκφραση της GPX3. Η μελέτη έδειξε σημαντικά υψηλότερη έκφραση στους καλοήθεις επιθηλιακούς ιστούς, σε σύγκριση με ιστούς καρκινώματος *in situ* και σημαντικά χαμηλότερη έκφραση της GPX3 στο διηθητικό καρκίνωμα του οισοφάγου. [144]. Παρόμοια αποτελέσματα για τον καρκίνο του οισοφάγου έδειξε και η μελέτη των Yuanlong He et al [145]. Σε άλλη μελέτη των Lee OJ et al παρατηρήθηκε επίσης μείωση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της GPX3 στο καρκίνωμα του οισοφάγου σε σύγκριση με φυσιολογικό οισοφαγικό

ιστό και με οισοφαγικό ιστό βιοψιών οισοφάγου Barrett και δυσπλασίας. Είναι μάλιστα ενδιαφέρον ότι ο βαθμός μείωσης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της GPX3 συσχετίστηκε με το μοτίβο υπερμεθυλίωσης του γονιδιακού προαγωγέα [146].

Τύπος	GPX προφίλ	Πηγή
Καρκίνος οισοφάγου	Αυξημένη έκφραση Gpx2, Μειωμένη έκφραση GPX3	Mørk, H., Scheurlen, M., Al-Taie, O., Zierer, A., Kraus, M., Schottker, K., et al. [2003]. Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus. <i>International Journal of Cancer</i> , 105, 300–304.
Γαστρικός καρκίνος	Μείωση έκφρασης GPX1 και GPX4 mRNA	Lan, X., Xing, J., Gao, H., Li, S., Quan, L., Jiang, Y., et al. [2017]. Decreased expression of selenoproteins as a poor prognosticator of gastric cancer in humans. <i>Biological Trace Element Research</i> , 178, 22–28.
	Μειωμένη έκφραση GPX3	Zhang, X., Yang, J. J., Kim, Y. S., Kim, K. Y., Ahn, W. S., & Yang, S. [2010]. An 8-gene signature, including methylated and down-regulated glutathione peroxidase 3, of gastric cancer. <i>International Journal of Oncology</i> , 36, 405–414.
Καρκίνος παχέος εντέρου	Αυξημένη έκφραση GPX2 Μειωμένη έκφραση GPX3	Murawaki, Y., Tsuchiya, H., Kanbe, T., Harada, K., Yashima, K., Nozaka, K., et al. [2008]. Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. <i>Cancer Letters</i> , 259, 218–230.
	Μειωμένη έκφραση GPX1 mRNA	Nalkiran, I., Turan, S., Arıkan, S., Kahraman, O. T., Acar, L., Yaylım, I., et al. [2015]. Determination of gene expression and serum levels of MnSOD and GPX1 in colorectal cancer. <i>Anticancer Research</i> , 35, 255–259.
	Αυξημένη έκφραση GPX1 και GPX4 πρωτεϊνικό όσο και σε mRNA επίπεδο	Yagublu, V., Arthur, J. R., Babayeva, S. N., Nicol, F., Post, S., & Keese, M. [2011]. Expression of selenium-containing proteins in human colon carcinoma tissue. <i>Anticancer Research</i> , 31, 2693–2698.
Καρκίνος ήπατος	Σε TGF α /c-myc διαγονιδιακά ποντίκια οι πρωτεΐνες GPX1 και GPX4 παρουσίαζαν κάτω σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς	Gladyshev, V. N., Factor, V. M., Housseau, F., & Hatfield, D. L. [1998]. Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 251, 488–493.
	GPX2 υπερέκφραση	Suzuki, S., Pitchakarn, P., Ogawa, K., Naiki-Ito, A., Chewonarin, T., Punfa, W., et al. [2013]. Expression of glutathione peroxidase 2 is associated with not only early hepatocarcinogenesis but also late stage metastasis. <i>Toxicology</i> , 311, 115–123.
	Μειωμένη έκφραση GPX3 πρωτεΐνης	Qi, X., Ng, K. T., Lian, Q. Z., Liu, X. B., Li, C. X., Geng, W., et al. [2014]. Clinical significance and therapeutic value of glutathione peroxidase 3 [GPx3] in hepatocellular carcinoma. <i>Oncotarget</i> , 5, 11103–11120.
	Μειωμένη ρύθμιση GPX6 m	Aravalli, R. N., Talbot, N. C., & Steer, C. J. [2015]. Gene expression profiling of MYCdriven tumor signatures in

	RNA	porcine liver stem cells by transcriptome sequencing. <i>World Journal of Gastroenterology</i> , 21, 2011–2029.
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα	Υπερέκφραση GPX1, GPX3 και GPX4 μειωμένη έκφραση	Rudenko, E., Kondratov, O., Gerashchenko, G., Lapska, Y., Kravchenko, S., Koliada, O., et al. [2015]. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas. <i>Experimental Oncology</i> , 37, 105–110.
	Η δραστηριότητα GPX ήταν μειωμένη σε όγκους σε σύγκριση με μη-καρκινικούς γειτονικούς ιστούς	Durak, I., Beduk, Y., Kavutcu, M., Ozturk, S., Canbolat, O., & Ulutepe, S. [1997]. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes in cancerous and noncancerous human kidney tissues. <i>International Urology and Nephrology</i> , 29, 5–11.
Καρκίνος πνεύμονα	Αυξημένη έκφραση GPX2	W€onckhaus, M., Klein-Hitpass, L., Grepmeier, U., Merk, J., Pfeifer, M., Wild, P., et al. [2006]. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. <i>The Journal of Pathology</i> , 210, 192–204.
Καρκίνος προστάτη	Μειωμένη έκφραση GPX1 πρωτεΐνης	Gladyshev, V. N., Factor, V. M., Housseau, F., & Hatfield, D. L. [1998]. Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 251, 488–493.
	Μειωμένη έκφραση GPX3	Yu, Y. P., Yu, G., Tseng, G., Cieply, K., Nelson, J., Defrances, M., et al. [2007]. Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. <i>Cancer Research</i> , 67, 8043–8050.
	Αυξημένη έκφραση GPX2	Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Kawai, N., Tozawa, K., Etani, T., et al. [2014]. GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration-resistant prostate cancer. <i>Carcinogenesis</i> , 35, 1962–1967.
Καρκίνος μαστού	Μειωμένη έκφραση GPX1	Esworthy, R. S., Baker, M. A., & Chu, F. F. [1995]. Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines. <i>Cancer Research</i> , 55, 957–962.
	Αυξημένη έκφραση GPX2	Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Takahashi, S., Yamashita, H., Tsuda, H., et al. [2007]. Gpx2 is an overexpressed gene in rat breast cancers induced by three different chemical carcinogens. <i>Cancer Research</i> , 67, 11353–11358.

Πίνακας 1. 6: προφίλ GPX σε διαφορετικά καρκινώματα [121].

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε αρχειακό βιοπτικό υλικό από 32 ασθενείς με ΔΝΚΚ οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ολική νεφρεκτομή στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας από το 2001 έως 2005. Από τους 32 ασθενείς με ΔΝΚΚ, 20 (62.5%) ήταν άνδρες και 12 (37.5%) ήταν γυναίκες με ηλικιακό εύρος 34-86 με διάμεση ηλικία τα 65,18 έτη.

Όλοι οι ιστοί προέρχονται από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Χρησιμοποιήθηκαν τομές από 32 ΔΝΚΚ, τα οποία μονιμοποιήθηκαν σε υδατικό διάλυμα φορμαλδεΐδης και εμπεδώθηκαν σε παραφίνη.

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές πάχους 4μ οι οποίες ελήφθησαν με μικροτόμο και τοποθετήθηκαν σε θετικά φορτισμένα πλακίδια.

2.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών GPX1, GPX3 στο ΔΝΚΚ αξιολογήθηκε σε ιστολογικές τομές που εχρώσθησαν σύμφωνα με την κατωτέρω μεθοδολογία:

- ✓ Ιστολογικές τομές πάχους 4μm που λήφθηκαν με μικροτόμο, τοποθετήθηκαν σε θετικά φορτισμένα πλακίδια.
- ✓ Αρχικά αποπαραφινώθηκαν σε κλίβανο στους 62°C overnight.
- ✓ Οι τομές τοποθετήθηκαν σε χύτρα ταχύτητας Biocare σε pH9 , στους 100 βαθμούς για 20 λεπτά
- ✓ Εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης έγινε σε υδατικό διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Έγινε έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBST 3 φορές.
- ✓ Στην συνέχεια έγινε εναπόθεση πρωτογενούς αντισώματος overnight στους 4° C για GPX1 1/50, GPX3 1/200 (τεχνικά χαρακτηριστικά παρακάτω).
- ✓ Έκπλυση τομών 3 φορές με TBST.
- ✓ Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με αντιδραστήριο Enhancer
- ✓ Έκπλυση με 3 φορές με TBST.
- ✓ Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με polymer
- ✓ Έκπλυση 3 φορές με TBST.

- ✓ Επώαση των τομών για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου το χρωμογόνο υπόστρωμα 3,3' διαμινοβενζιδίνη (DAB) δείχνοντας μας την ύπαρξη επιτόπου στην τομή με ένα καφετί χρώμα.
- ✓ Ξέπλυμα των τομών 3 φορές με TBST.
- ✓ Προσθήκη αιματοξυλίνης για 3 λεπτά ώστε να έχουμε την αντίθεση στο χρώμα.
- ✓ Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.
- ✓ Αφυδάτωση του ιστού σε ανιούσα σειρά αλκοολικών διαλυμάτων.
- ✓ Και ξυλόλη για 10 λεπτά.
- ✓ Επικάλυψη με καλυπτρίδα με την βοήθεια κόλλας.
- ✓ Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: για την GPX3 φυσιολογικός παρακείμενος ιστός των δειγμάτων και για τη GPX1 ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.
- ✓ Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές οι οποίες επώασθηκαν με μη αντιγονικό ορό αντί για το πρωτογενές αντίσωμα.

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν:

* Για το αντίσωμα **GPX-1:**

Κλώνος → πολυκλωνικό

Εταιρεία → ORIGENE

Κωδικός → AP 51937PU-N

Ξενιστής / ισότυπο → κουνέλι / Ig

Θετικός Μάρτυρας → ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Αραίωση → 1/50

Χρόνος επώασης/θερμοκρασία → overnight /4°C.

* Για το αντίσωμα **GPX-3:**

Κλώνος → πολυκλωνικό

Εταιρεία → NOVUS BIOLOGICALS [NBP1- 06398]

Ξενιστής/ ισότυπο → κουνέλι /IgG

Θετικός Μάρτυρας → φυσιολογικός νεφρός

Αραίωση → 1/200

Χρόνος επώασης/θερμοκρασία → overnight/ 4°C

2.3 Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της εντόπισης και της έκτασης της χρώσης ως ποσοστό θετικότητας στην ιστολογική τομή του όγκου. Η εκτίμηση της χρώσης έγινε με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, όπου καταγράφηκαν η έκταση της χρώσης στον όγκο που παρουσίαζε θετικότητα και η ένταση της χρώσης. Με 0 βαθμολογήθηκε η απουσία χρώσης, με 1 η ασθενής θετικότητα, με 2 η μέτρια χρώση και με 3 έντονη χρώση σε σχέση με την ένταση στο θετικό μάρτυρα. Η ένταση της χρώσης και η έκτασή της (ποσοστό επιφάνειας όγκου με θετική χρώση) πολλαπλασιάστηκαν για να δώσουν ένα συνολικό ανοσοϊστοχημικό σκορ έκφρασης. Τελικά, η κλίμακα χρώσης κυμαινόταν από μια ελάχιστη τιμή 0 (απουσία χρώσης) έως μέγιστη τιμή 300 (100% των κυττάρων με βαθμολογία έντασης χρώσης 3).

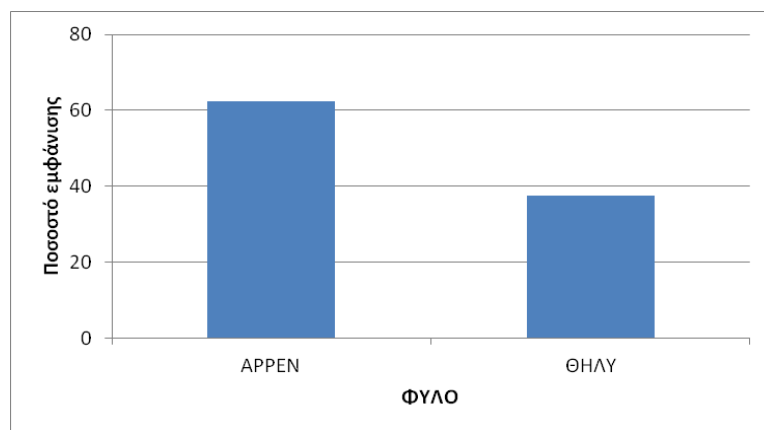
2.4 Στατιστική ανάλυση

Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών GPX-1 και GPX-3 και των διάφορων παθολογοανατομικών, κλινικών και δημογραφικών χαρακτηριστικών εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τις δοκιμασίες Spearman's Rank-Order και Point-Biserial Correlation κατά περίπτωση.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

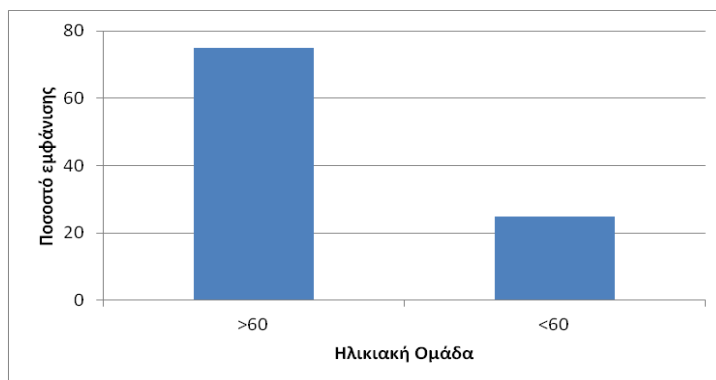
3.1 Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών

Το δείγμα μελέτης αποτελούνταν από 32 ασθενείς με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού. Οι ασθενείς ήταν άρρενα άτομα στο 62,5% και στο 37,5% ήταν θήλεα άτομα.



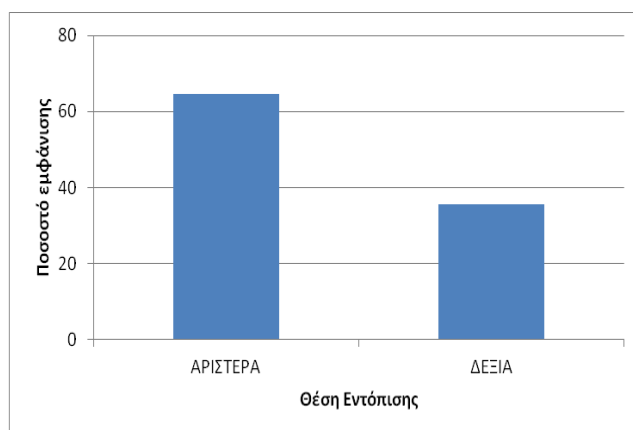
Γράφημα 1: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος, με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού ανά φύλο.

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών της μελέτης ήταν τα $65,18 \pm 13,34$ έτη με ελάχιστη τιμή τα 34 έτη και μέγιστη τιμή τα 86 έτη.



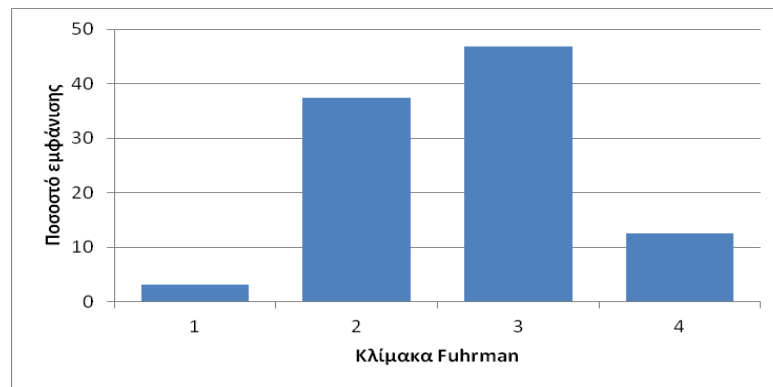
Γράφημα 2: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος ανα ηλικιακή ομάδα (<60 και >60.)

Όσο αφορά την εντόπιση του όγκου, στο 64,5% των ασθενών ο όγκος εντοπίστηκε στον αριστερό νεφρό ενώ στο 35,5% εντοπίστηκε στον δεξιό νεφρό.



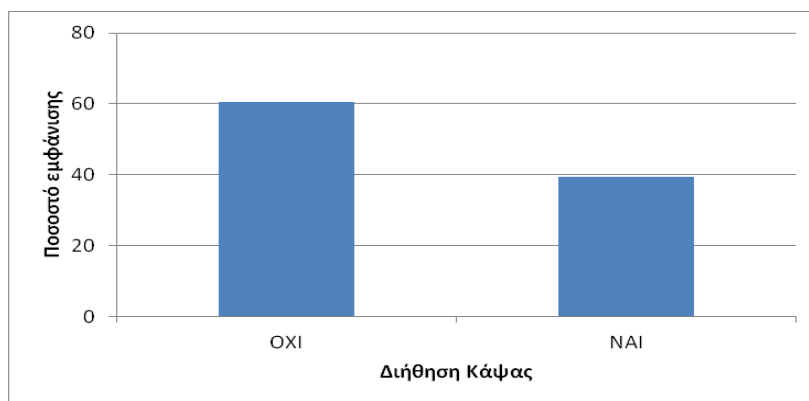
Γράφημα 3: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος ανά θέση εντόπισης του όγκου.

Ο πυρηνικός βαθμός διαφοροποίησης (grade) κατά Fuhrman, κυμάνθηκε από 1 έως 4. Ειδικότερα, το 3,125% είχαν βαθμό κατά Fuhrman 1, το 37,5% είχαν βαθμό κατά Fuhrman 2, το 46,785% είχαν βαθμό κατά Fuhrman 3 και το 12,5% των ασθενών είχαν βαθμό κατά Fuhrman 4.



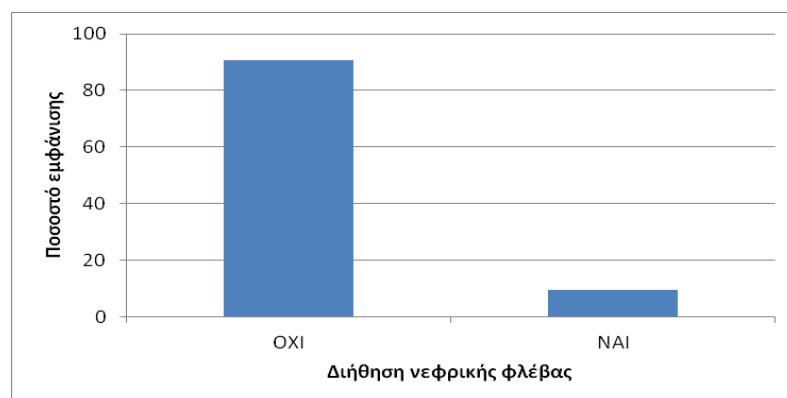
Γράφημα 4: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος κατά βαθμό κακοήθειας κατά Fuhrman (grade).

Όσον αφορά την διήθηση της κάψας, το 60,6% δεν παρουσίαζαν διήθηση της νεφρικής κάψας ενώ το 39,4% των ασθενών ταυτοποιήθηκε το συγκεκριμένο ιστοπαθολογικό εύρημα.



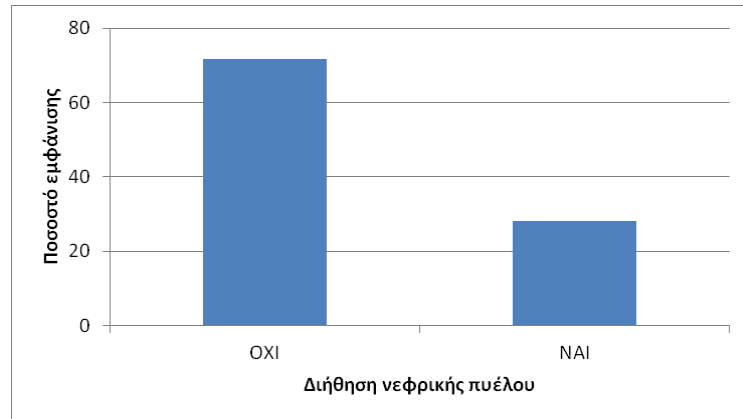
Γράφημα 5: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με την παρουσία της διήθησης της κάψας.

Όσον αφορά την διήθηση της νεφρικής φλέβας, το 90,6% δεν παρουσίαζαν διήθηση της νεφρικής φλέβας ενώ στο 9,4% εντοπίστηκε διήθηση.



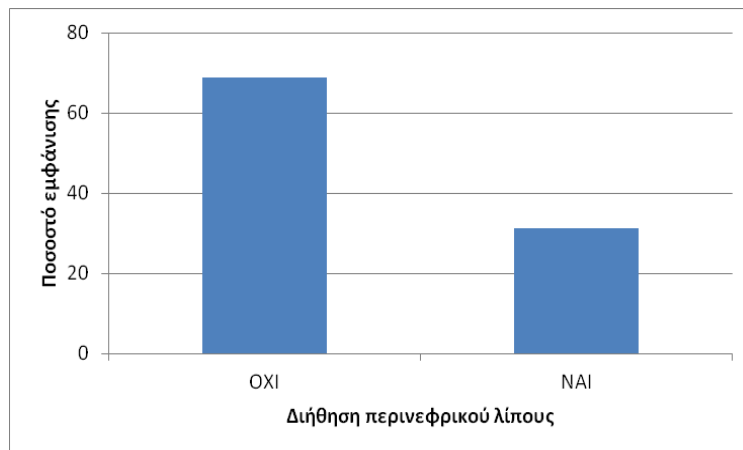
Γράφημα 6: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με την παρουσία της διήθησης νεφρικής φλέβας.

Αναφορικά με την διήθηση της νεφρικής πυέλου, το 71,8% δεν παρουσίαζαν διήθηση ενώ στο 28,2% εντοπίστηκε διήθηση της νεφρικής πυέλου.



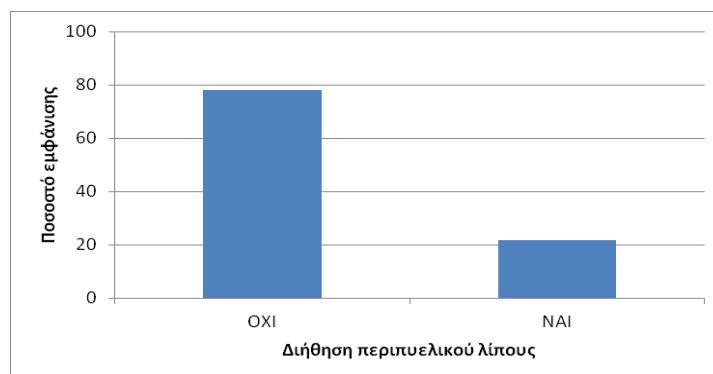
Γράφημα 7: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με την παρουσία της διήθησης της νεφρικής πυέλου.

Επιπρόσθετα, στο 68,8% δεν εντοπίστηκε διήθηση του περινεφρικού λίπους ενώ στο 31,2% εντοπίστηκε.



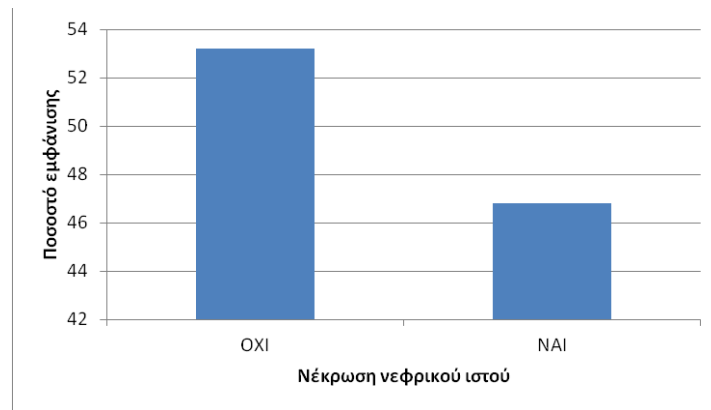
Γράφημα 8: Ποσοστό των ασθενών αναφορικά με την παρουσία διήθησης περινεφρικού λίπους.

Το 78,2% δεν παρουσίασε διήθηση του περιπυελικού λίπους ενώ το 21,8% παρουσίασε.



Γράφημα 9: ποσοστό ασθενών αναφορικά με την παρουσία διήθησης περιπυελικού λίπους.

Επιπλέον, το 53,2% δεν παρουσίασαν νέκρωση του νεφρικού ιστού ενώ το 46,8% παρουσίασε.

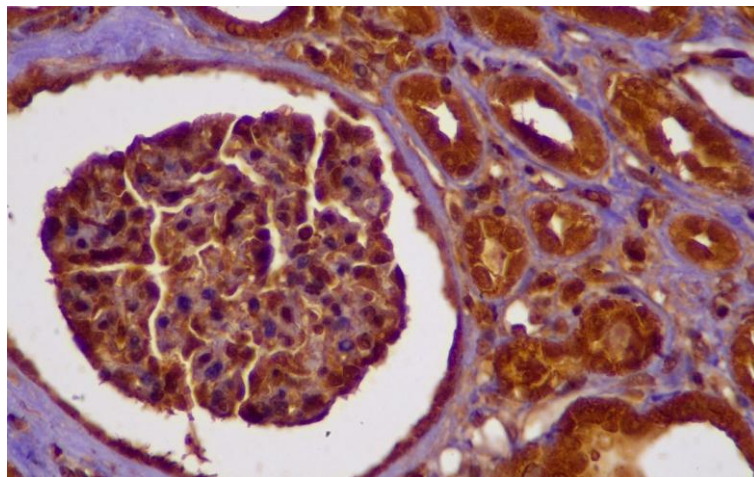


Γράφημα 10: ποσοστό ασθενών αναφορικά με την παρουσία νέκρωσης.

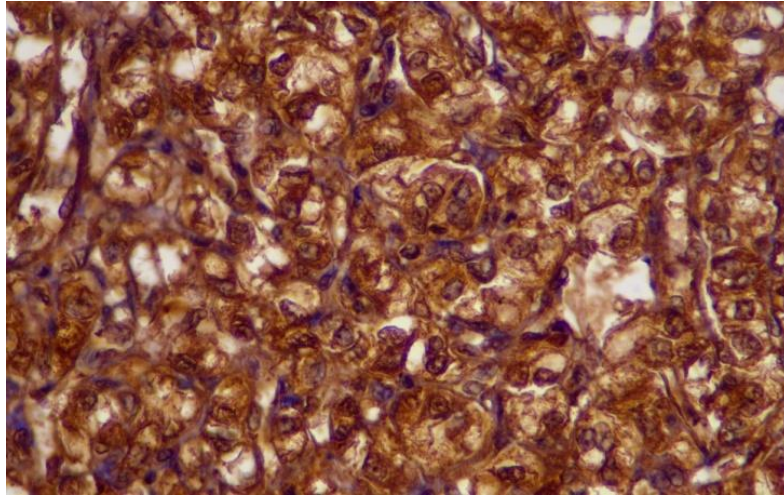
3.2 Φωτογραφική απεικόνιση της έκφρασης των GPX1 και GPX3

Μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας και την αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, έγινε φωτογράφιση των πλακιδίων ανοσοϊστοχημείας, όπου εμφανίζονται οι διακυμάνσεις της χρώσης και οι διαφορές τους με το παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (Εικόνες 3.1 έως 3.8)

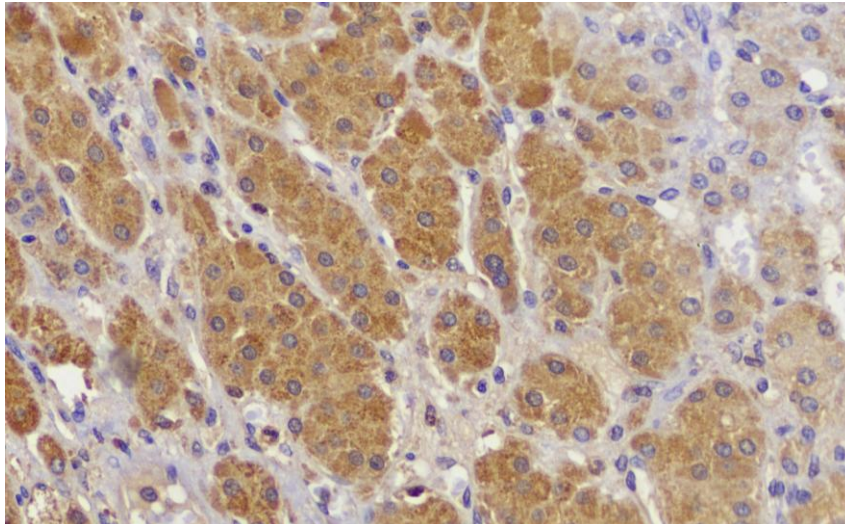
3.2.1 Έκφραση της GPX1



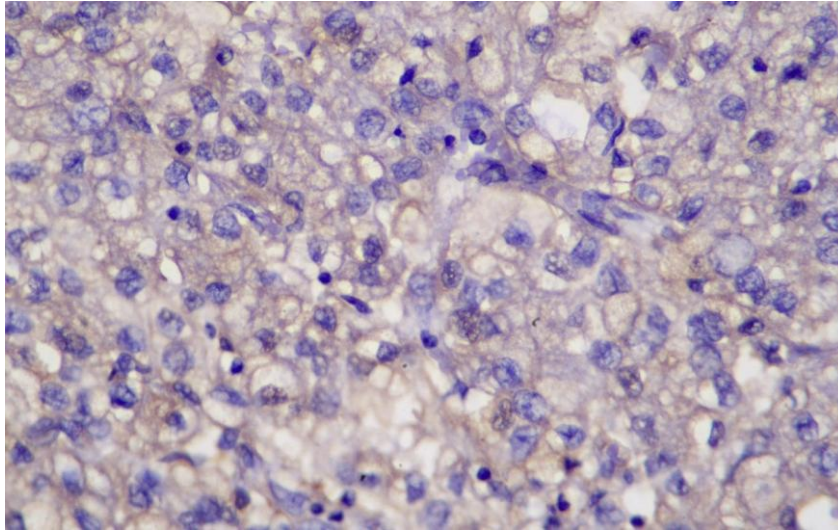
Εικόνα 3.1: Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPX1 πρωτεΐνης σε μη-νεοπλασματικό νεφρικό παρέγχυμα. Παρατηρείται έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση στα κύτταρα του σπειράματος και στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς ουροφόρων σωληναρίων, (Histscore 300, θετικός μάρτυρας) (ανοσοϊστοχημική χρώση, X40)



Εικόνα 3.2: Διαγλυκτωτικό ΝΚΚ , βαθμού πηληνικής διαφοροποίησης Fuhrman 3 με έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση GPX1. (Histoscore 300). (ανοσοϊστοχημική χρώση, X40)

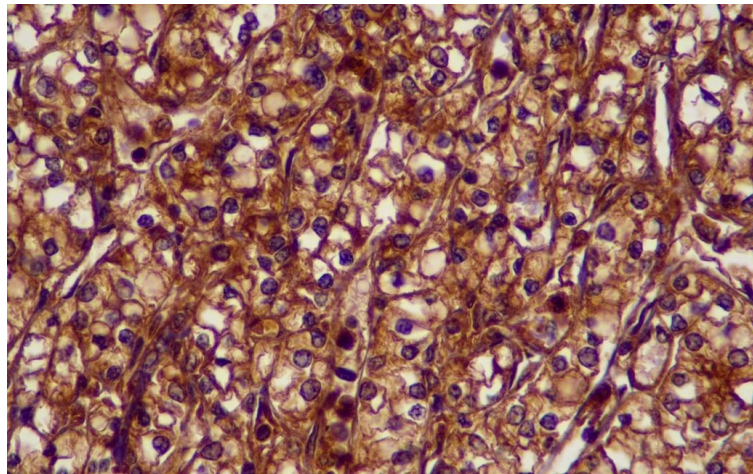


Εικόνα:3.3: Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPX1 πρωτεΐνης. ΔΝΚΚ βαθμού πηληνικής διαφοροποίησης Fuhrman 2 με μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση GPX1. (Histoscore 160). (ανοσοϊστοχημική χρώση, X40)

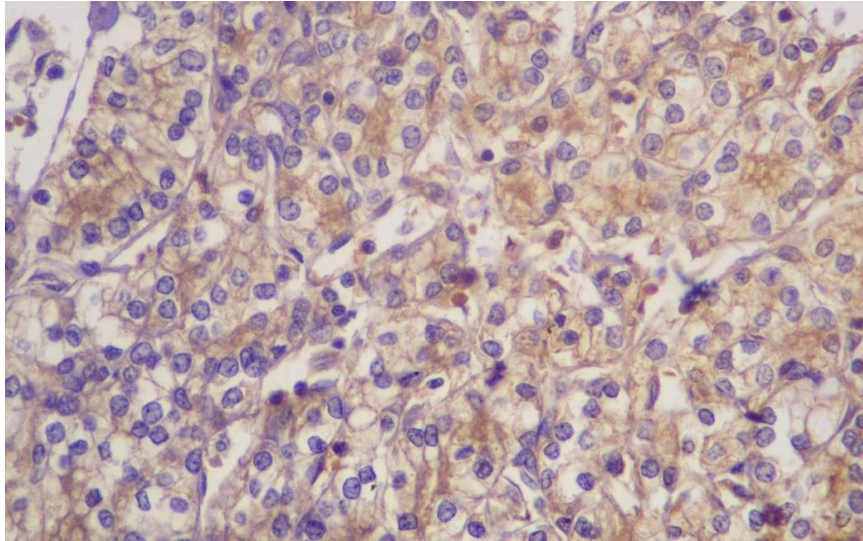


***Εικόνα 3.4:** Διαγυοκυτταρικό καρκίνωμα Furhman 3, με ασθενή εστιακή ανοσοϊστοχημική έκφραση (Histoscore 80). (ανοσοϊστοχημική χρώση, X40)*

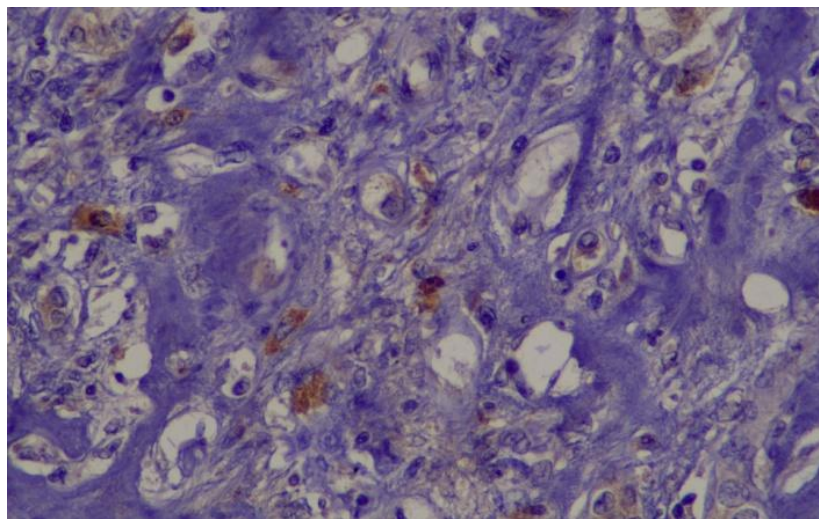
3.2.2 Έκφραση της GPX3



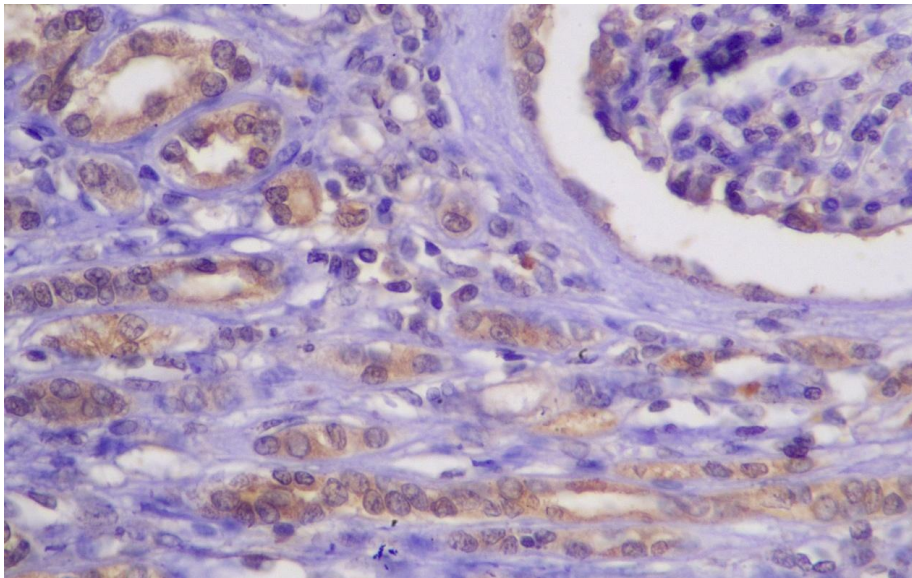
***Εικόνα 3.5:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPX3 πρωτεΐνης Διαγυοκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού πυρηνικής διαφοροποίησης Furhman 2 με έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση GPX3 (Histoscore 300). (ανοσοϊστοχημική χρώση, X40)*



Εικόνα 3.6: Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPX3 πρωτεΐνης Διαγωγκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού πυρηνικής διαφοροποίησης Furhman 3, με ασθενή εστιακή ανοσοϊστοχημική έκφραση GPX3 (HistoScore 180). (ανοσοϊστοχημική χρώση, X40)



Εικόνα 3.7: Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPX3 πρωτεΐνης Διαγωγκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού πυρηνικής διαφοροποίησης Furhman 4, με απουσία ανοσοϊστοχημική έκφρασης για GPX3 (HistoScore 0). (ανοσοϊστοχημική χρώση, X40)



Εικόνα 3.8: Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPX3 πρωτεΐνης. παρακείμενο μη νεοπλασματικό νεφρικό παρέγχυμα. κυτταροπλασματική θετικότητα στα κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων και απουσία έκφρασης στο σπείραμα. ανοσοϊστοχημική χρώση X40

3.3 Στατιστική επεξεργασία της έκφρασης των GPX1 και GPX3

Αναφορικά με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της GPX-1, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση του συνολικού ανοσοϊστοχημικού σκορ με το βαθμό διαφοροποίησης κατά Fuhrman. Ομοίως βρέθηκε θετική συσχέτιση της GPX-1 με την διήθηση νεφρική φλέβας, τη διήθηση του περινεφρικού και του περιπυελικού λίπους. Δεν τεκμηριώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη διήθηση της κάψας, τη διήθηση της νεφρικής πυέλου και την νέκρωση. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στο συνολικό ιστολογικό σκορ έκφρασης της GPX-1 και την ηλικία, το φύλο, την εντόπιση ή το μέγεθος του όγκου. ($p > 0.05$).

Για την GPX-3, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση του συνολικού ανοσοϊστοχημικού σκορ έκφρασης της με το βαθμό κακοήθειας κατά Fuhrman. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στο ανοσοϊστοχημικό σκορ έκφρασης της GPX-3 και την ηλικία, το φύλο, την εντόπιση ή το μέγεθος του όγκου. ($p > 0.05$).

Όλα τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1 και στα γραφήματα 11 έως 18.

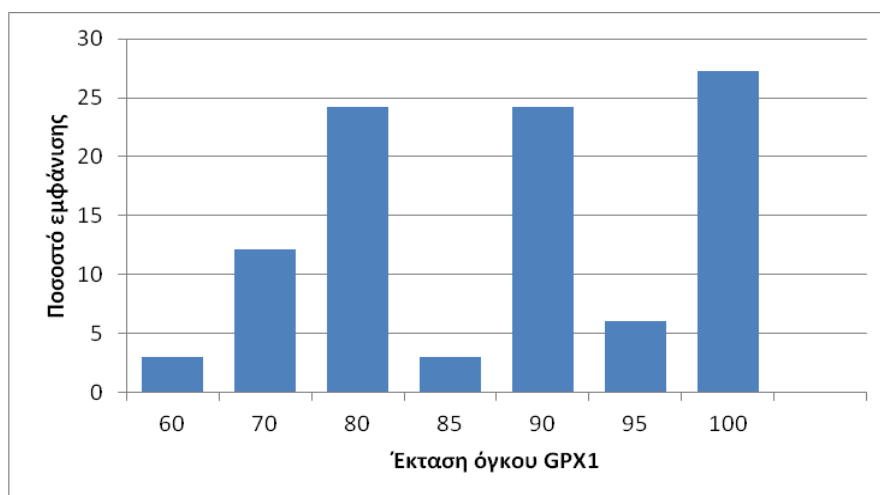
Πίνακας 3.1 : Συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών GPX-1 και GPX-3 με τους παθολογοανατομικούς χαρακτήρες του καρκινώματος: βαθμός διαφοροποίησης κατά Fuhrman

(Fuhrman), διήθηση νεφρικής φλέβας (ΔΝΦ), διήθηση περινεφρικού λίπους (ΔΠΝΛ), διήθηση περιπυελικού λίπους (ΔΠΠΛ), διήθηση κάψας (ΔΚ), διήθηση νεφρικής πυέλου (ΔΝΠ), νέκρωση (ΝΚ).

	Fuhrman	ΔΝΦ	ΔΠΝΛ	ΔΠΠΛ	ΔΚ	ΔΝΠ	ΝΚ
GPX-1							
r_s value	0.804	0.368	0.360	0.425	0.297	0.330	-0.186
p -value	0.000	0.038	0.043	0.015	0.098	0.065	0.309
GPX-3							
r_s value	-0.771	-0.282	-0.339	-0.246	-0.331	-0.154	-0.068
p -value	0.000	0.118	0.057	0.175	0.064	0.400	0.711

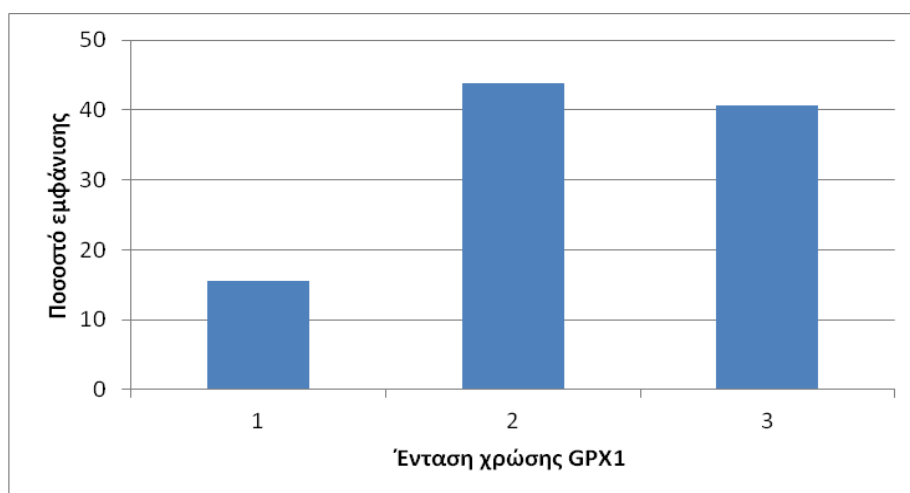
3.3.1 στατιστική Επεξεργασία για την GPX1

Θετική ανοσοχρώση της GPX-1 εντοπίστηκε σε ποσοστό από 60-100 της έκτασης του όγκου. Ειδικότερα, το 27,27% παρουσίασε θετική ανοσοχρώση της GPX-1 στο 100% του όγκου ενώ το 24,24% των ασθενών παρουσίασε θετική ανοσοχρώση της GPX-1 στο 90% του όγκου. Ίδιο ποσοστό ασθενών (20,7%) παρουσίασε θετική ανοσοχρώση της GPX-1 στο 80% της έκτασης του όγκου.



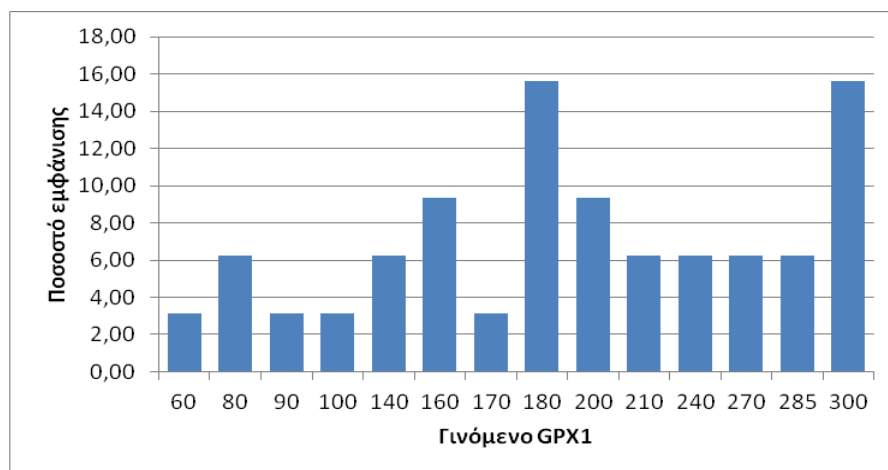
Γράφημα 11: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με το ποσοστό θετικής ανοσοχρώσης της GPX1 στην έκταση του όγκου.

Το 40,625 % των ασθενών παρουσίασε 3+ ένταση θετική ανοσοχρώση της GPX1 ενώ το 43,75% παρουσίασε 2+ και το 15,625% παρουσίασε 1+ ένταση θετικής ανοσοχρώσης.



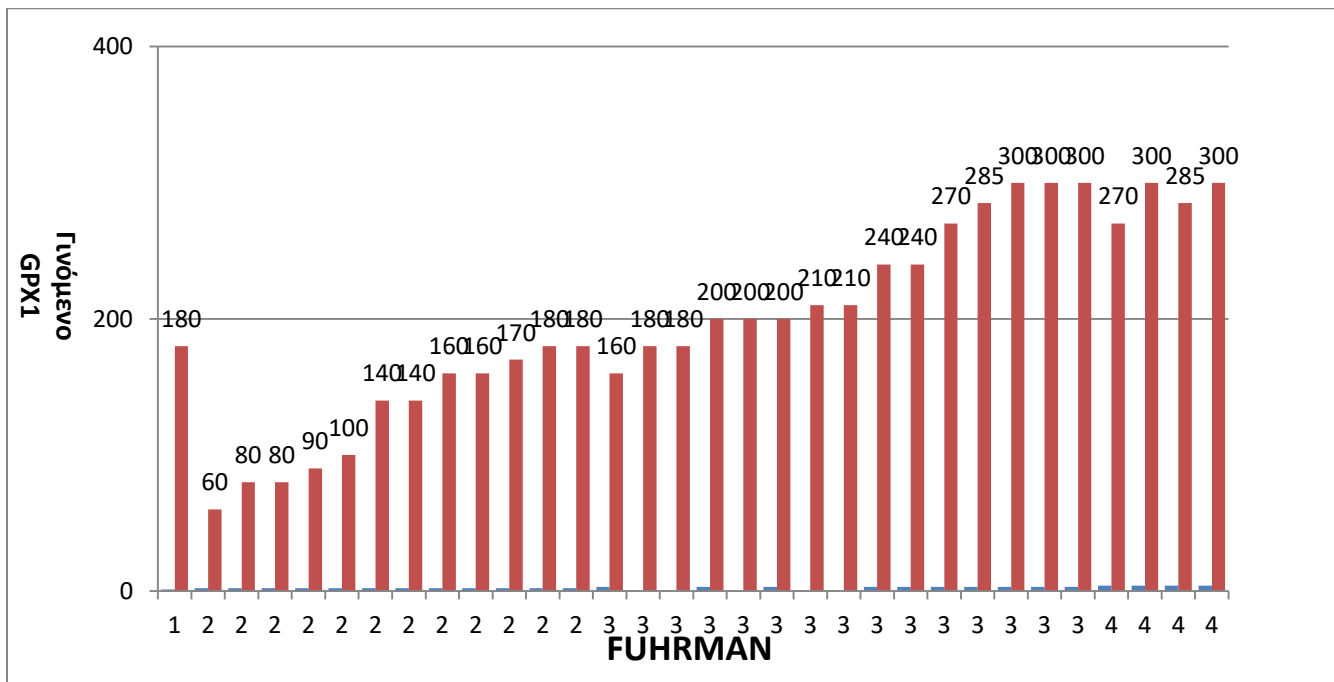
Γράφημα 12: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με την ένταση της ανοσοχρώσης της GPX1.

Το συνολικό σκορ έντασης το οποίο υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό των θετικών κυττάρων στην ανοσοχρώση GPX1 και την ένταση της χρώσης κυμάνθηκε από 60-300. Το 15,63% είχε σκορ 300 και 180 αντίστοιχα, επίσης ίδιο ποσοστό 9,38% εμφανίζεται στο 200 και 160, καθώς επίσης το ίδιο ποσοστό ασθενών 6,25% είχαν σκορ 285, 270, 240, 210, 140, 80 αντίστοιχα. Επιπρόσθετα το χαμηλότερο ποσοστό 3,13 εμφάνισαν αντίστοιχα το γινόμενο 60, 90, 100 και 170.



Γράφημα 13: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με το συνολικό σκορ της ανοσοχρώσης της GPX1.

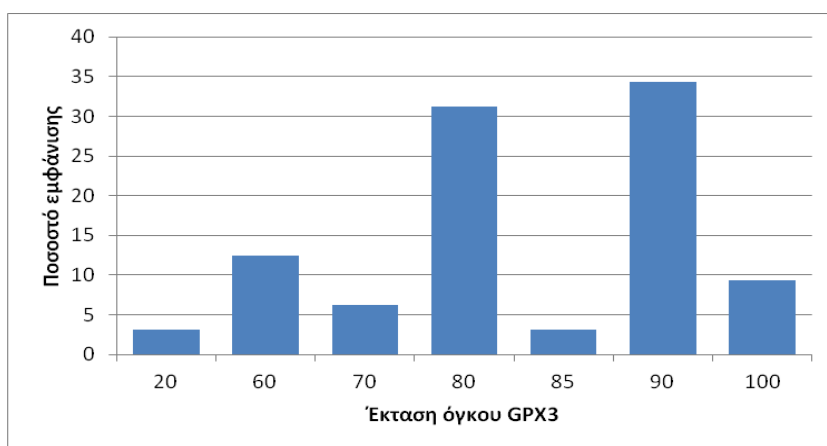
Κατανομή του πυρηνικού βαθμού διαφοροποίησης Fuhrman με το γινόμενο της GPX1, όπου εμφανίζεται θετική συσχέτιση.



Γράφημα 14: θετικής συσχέτισης του γινομένου GPX1 με τον πυρηνικό βαθμό διαφοροποίησης Fuhrman.

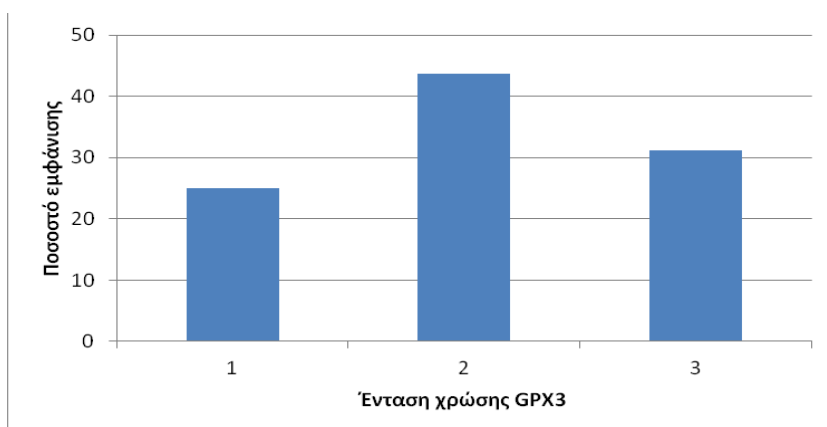
3.3.2 Στατιστική επεξεργασία για την GPX3

Θετική ανοσοχρώση της GPX-3 εντοπίστηκε σε ποσοστό από 20-100 της έκτασης του όγκου. Ειδικότερα, το 9,375% παρουσίασε θετική ανοσοχρώση της GPX-3 στο 100% του όγκου, το 34,375% των ασθενών παρουσίασε θετική ανοσοχρώση της GPX-3 στο 90% του όγκου και το ίδιο ποσοστό 3,125% στο 85 και 20 αντίστοιχα της έκτασης του όγκου, επίσης το 31,25% στο 80% του όγκου, το 6,25% στο 70% του όγκου και 12,5% στο 60% του όγκου



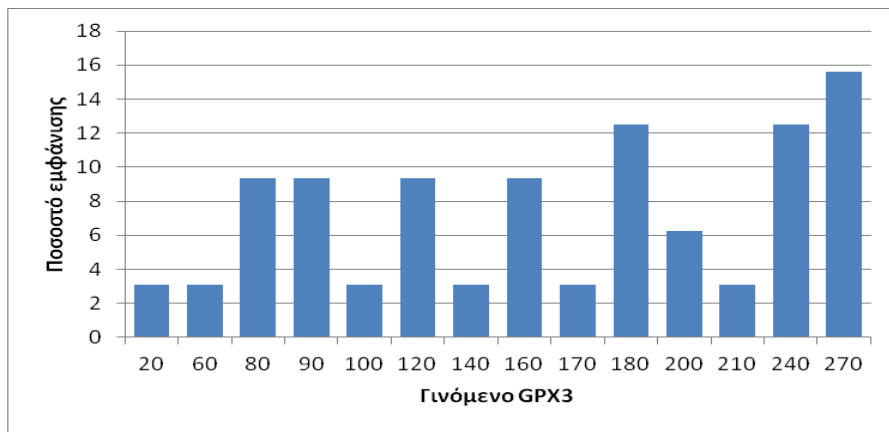
Γράφημα 15: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με το ποσοστό θετικής ανοσοχρώσης της GPX3 στην έκταση του όγκου.

Το 25% των περιστατικών παρουσίασε 1+ ένταση θετική ανοσοχρώση της GPX3 ενώ το 43,75% και το 31,25% παρουσίασε 2+ και 3+ ένταση θετικής ανοσοχρώσης, αντίστοιχα.



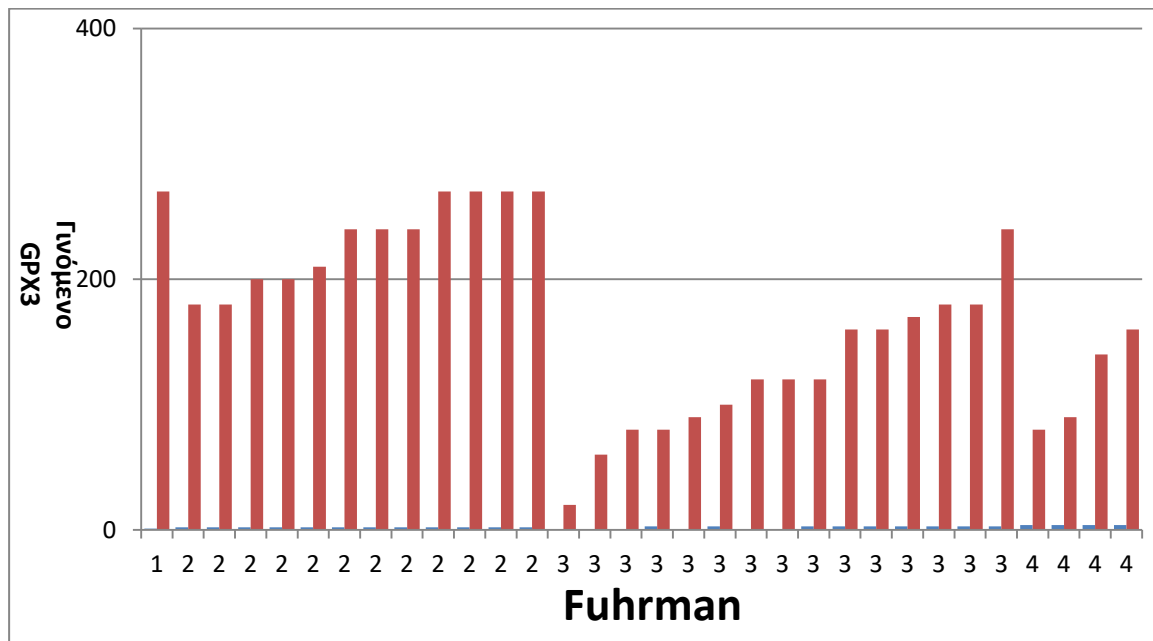
Γράφημα 16: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με την ένταση της ανοσοχρώσης της GPX3.

Το συνολικό σκορ έντασης της ανοσοχρώσης GPX-3 κυμάνθηκε από 20-270. Το 15,625% των ασθενών είχε σκορ 270, ενώ το ίδιο ποσοστό ασθενών 12,5% είχαν συνολικό σκορ 240 και 180. Επιπρόσθετα, το ίδιο ποσοστό είχε 9,375% των ασθενών είχαν συνολικό σκορ έντασης 160, 120, 90, 80 αντίστοιχα ενώ το 6,25% το 200. Τέλος το ίδιο ποσοστό 3,125% στο σκορ 210, 170, 140, 100, 60, 20.



Γράφημα 17: Ποσοστό των ασθενών του δείγματος αναφορικά με το συνολικό σκορ της ανοσοχρώσης της GPX3.

Κατανομή του πυρηνικού βαθμού διαφοροποίησης Fuhrman με το γινόμενο της GPX1, όπου εμφανίζεται θετική συσχέτιση.



Γράφημα 18: Αρνητική συσχέτισης του γινομένου GPX1 με τον πυρηνικό βαθμό διαφοροποίησης Fuhrman.

IV ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ΝΚΚ είναι μορφολογικά και γενετικά ετερογενής κακοήθεια που προκύπτει από εξειδικευμένα κύτταρα του νεφρού [147]. Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (ΝΚΚ) αντιπροσωπεύει περίπου 3% όλων των κακοηθειών των ενηλίκων και υπάρχει μια συνεχής αύξηση των νέων περιστατικών κατά την διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας [148]. Το ΝΚΚ εμφανίζεται κυρίως την έκτη έως την όγδοη δεκαετία της ζωής με ενδιάμεση ηλικία διάγνωσης περίπου τα 64 έτη, ενώ είναι ασυνήθιστο σε ασθενείς κάτω των 40 ετών και κατ' εξαίρεση στα παιδιά [149]. Είναι πιο συχνός στους άνδρες παρά στις γυναίκες (αναλογία 1,5:1) [150]. Περισσότερο από το 50% είναι ασυμπτωματικές περιπτώσεις κατά την διάρκεια απεικονιστικών μεθόδων και ανακαλύπτονται τυχαία [151]. Μόνο το 10% των ατόμων με ΝΚΚ εμφανίζει την κλασική τριάδα αιματουρία, πόνο και πλευρική μάζα και τα άτομα αυτά έχουν συχνότερα προχωρημένη ασθένεια [152]. Τα κύρια επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του καρκίνου των νεφρών είναι οι μεγάλες γεωγραφικές και χρονικές μεταβολές στα ποσοστά των επιπτώσεων [153]. Πολλοί παράγοντες πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην αύξηση και ανάπτυξη του ΝΚΚ, όπως το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η υπέρταση, διατροφικοί παράγοντες και επαγγελματικοί παράγοντες [19]. Ενώ υπάρχουν περισσότεροι από δέκα αναγνωρισμένοι υπότυποι του ΝΚΚ, οι τρεις πιο συνηθισμένοι είναι το διαυγοκυτταρικό ~75% των περιπτώσεων, το θηλώδες ~20% των περιπτώσεων και το χρωμόφοβο ~5% των περιπτώσεων [81]. Εκτός από αυτούς τους τρεις επαναλαμβανόμενους σποραδικούς τύπους, υπάρχουν και κληρονομικές περιπτώσεις που αντιπροσωπεύουν περίπου το 5% όλων των περιπτώσεων ΝΚΚ και χαρακτηρίζονται από ειδικές γονιδιακές βλάβες [154].

Η ανοσοϊστοχημεία είναι ημιποσοτική μέθοδος τυποποίησης κυττάρων και ιστών μέσω της ανάδειξης της αντιγονικής τους ταυτότητας, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες, μεταγραφικούς παράγοντες και άλλα κυτταρικά χαρακτηριστικά. Η ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση και ταξινόμηση των κακοήθων όγκων [155]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, η ανοσοϊστοχημεία συνεισφέρει σημαντικά στην κλινική διαστρωμάτωση των κακοήθων όγκων. Με βάση ειδικούς ανοσοϊστοχημικούς δείκτες, που έχουν κατοχυρωθεί βιβλιογραφικά, αναγνωρίζονται, ανάμεσα σε ασθενείς με τον ίδιο νεοπλασματικό όγκο, εκείνοι που προβλέπεται πως θα διαφέρουν στην κλινική ανταπόκριση και πρόγνωση [156]. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs) ανήκουν σε μια φυλογενετική οικογένεια συγγενών ενζύμων [122]. Υπάρχουν 8 μέλη της οικογένειας GPX, που ορίζονται σύμφωνα με την αλληλουχία αμινοξέων, την ειδικότητα του υποστρώματος και την κυτταρική εντόπιση [157]. Οι GPX1, GPX2, GPX3, GPX5, GPX6 είναι ομοτετραμερή ενώ τα υπόλοιπα δρουν ως μονομερή [157]. Στα θηλαστικά οι GPX1-4 είναι σεληνοπρωτεΐνες που περιέχουν μία σεληνοκυστεΐνη (Sec) στο καταλυτικό

κέντρο, και η GPX6 είναι μια σεληνοπρωτεΐνη που ανιχνεύεται μόνο στους ανθρώπους [122]. Ένας από τους κύριους ρόλους της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης είναι να αποτρέπει το λεγόμενο οξειδωτικό στρες που ευθύνεται για πολλές παθολογικές καταστάσεις και έχει επίσης ενοχοποιηθεί ως ογκογενετικός παράγοντας [119] [158].

Η έκφραση των GPX έχει μελετηθεί σε κακοήγη επιθηλιακά νεοπλάσματα και ορισμένοι συγγραφείς έχουν συσχετίσει την ανοσοϊστοχημική έκφραση ορισμένων από αυτές με την πρόγνωση [120, 124, 159, 119]. Συγκεκριμένα στο πλακώδες καρκίνωμα του λάρυγγα, της στοματικής κοιλότητας, και σε καρκινώματα του πνεύμονα, η υψηλή έκφραση της GPX1 συσχετίστηκε με δυσμενή κλινική έκβαση. Επίσης, η υψηλή έκφραση GPX1 συσχετίστηκε με υψηλή αγγειακή διήθηση και χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Στο ΔΝΚΚ υπάρχει πολύ περιορισμένος αριθμός σχετικών μελετών. Η βιβλιογραφική αναζήτηση για "GPX1 and RENAL CELL CARCINOMA" και "GPX3 and RENAL CELL CARCINOMA" στην βάση δεδομένων Pubmed απέδωσε επτά σχετικές δημοσιεύσεις, από τις οποίες μόνον σε δύο αναφέρεται ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία [126, 125, 119, 160, 161, 131, 161].

Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει 32 περιπτώσεις ΔΝΚΚ, που προέρχονται από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρόκειται για χειρουργικά παρασκευάσματα νεφρεκτομής από 32 ασθενείς οι οποίοι χειρουργήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας μεταξύ 2001-2005. Αρχικά μελετήθηκαν οι ιστολογικές εκθέσεις, έγινε καταγραφή των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων και επιλέχθηκαν οι κατάλληλες ιστολογικές τομές για την ανοσοϊστοχημική μελέτη. Η τελευταία περιελάμβανε τις χρώσεις για τις πρωτεΐνες GPX1 και GPX3. Στη συνέχεια μελετήθηκε ημιποσοτικά η έκφραση της κάθε πρωτεΐνης στην ιστολογική τομή του όγκου, αλλά και στους παρακείμενους μη νεοπλασματικούς ιστούς και αναζητήθηκαν οι συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης με γνωστούς προγνωστικούς κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες.

Στους ασθενείς της μελέτης μας η μέση ηλικία είναι τα $65,18 \pm 13,34$ έτη. Επίσης, στους ασθενείς της μελέτης μας διαφαίνεται η υπεροχή της επίπτωσης στους άνδρες από ότι στις γυναίκες με ποσοστά 62,5% και 37,5% αντίστοιχα. Τέλος, υπάρχει οριακή επικράτηση της εντόπισης του όγκου στον αριστερό νεφρό σε ποσοστό 64,5%. Το μέγεθος του όγκου $7,041 \pm 2,63$ εκ. με ελάχιστο μέγεθος τα 4 εκ. και μέγιστο τα 13εκ. Στο μεγαλύτερο ποσοστό δεν υπάρχουν διήθησης. Με τα ποσοστά να είναι, χωρίς διήθηση της κάψας στο 60,6% ενώ εμφανίζει διήθηση κάψας το 39,4% των περιστατικών. Διήθηση νεφρικής φλέβας δεν εμφανίζει το 90,6% ενώ μόνο στο 9,4% υπάρχει διήθηση νεφρικής φλέβας. Η διήθηση της νεφρικής πυέλου είναι στο 28,2% ενώ το υπόλοιπο 71,8% δεν έχει διήθηση νεφρικής πυέλου. Το 31,2%

των περιπτώσεων είναι με διήθηση περιπεφρικού λίπους ενώ το υπόλοιπό 68,8% δεν εμφανίζει διήθηση. Επίσης και για τη διήθηση του περιπυελικού λίπους μόνο το 21,8% εμφανίζει ενώ δεν υπάρχει διήθηση στο 78,2%. Τέλος τα ποσοστά της νέκρωσης του ιστού δίνουν νέκρωση στο 46,8% ενώ δεν υπάρχει νέκρωση στο 53,2%.

Στα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα της μελέτης μας ανιχνεύσαμε θετική έκφραση της GPX1. Η έκφραση ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία των ασθενών και από το φύλο. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην ανοσοϊστοχημική έκφραση της GPX-1 με το μέγεθος του όγκου ή με την εντόπισή του. Στις προηγούμενες μελέτες, τα ευρήματα ήταν παρόμοια [126,125]

Στα ΔΝΚΚ της μελέτης μας η πρωτεΐνη GPX1 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρήνα των νεοπλασματικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, κυτταροπλασματική εντόπιση της GPX-1 ανιχνεύθηκε στο 56,2% των περιπτώσεων (18/32) ενώ στο 43,7% (14/32) παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική και πυρηνική εντόπιση. Στις περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία, σε ποικίλα καρκινώματα, περιγράφεται η κυτταροπλασματική εντόπιση της GPX1 [119,125,126].

Επιπλέον, μία μελέτη σε αδενοκαρκίνωμα του προστάτη αναφέρει πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης [163]. Οι ανωτέρω διαφορές μεταξύ των ανοσοϊστοχημικών μελετών θα μπορούσαν να ερμηνευθούν ενδεχομένως λόγω της χρήσης διαφορετικών αντισωμάτων, και διαφορετικής μεθοδολογίας στην αντιγονική αποκάλυψη.

Χρησιμοποιώντας μία μέθοδο ημιποσοτικού υπολογισμού της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης σε ιστολογικές τομές, τα καρκινώματα της μελέτης μας διακρίθηκαν σε εκείνα με υψηλή έκφραση GPX1 (Histoscore >180) και σε καρκινώματα με χαμηλή έκφραση (Histoscore <180). Όπως φάνηκε στην κατανομή των καρκινωμάτων, η υψηλότερη έκφραση συσχετίζεται με τον υψηλότερο βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης 3 και 4 κατά Furhman. Δεδομένης της προγνωστικής σημασίας του βαθμού Furhman, τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να υποδεικνύουν το συμπληρωματικό ρόλο της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για GPX-1 στην ιστοπαθολογική εξέταση των καρκινωμάτων διαυγοκυτταρικού τύπου.

Επιπλέον, στη μελέτη μας βρήκαμε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της GPX1 με άλλους δυσμενείς προβλεπτικούς ιστολογικούς δείκτες όπως με τη διήθηση της νεφρικής φλέβας, την αγγειακή διήθηση και τη περινευρική διήθηση του όγκου. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ανακοινώσει και άλλοι ερευνητές [126,119]. Στη μελέτη των Y Cheng et al δείχθηκε πως η έκφραση της GPX1 ήταν σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα του ΔΝΚΚ σε σύγκριση με το παρακείμενο μη νεοπλασματικό νεφρικό παρέγχυμα. Επίσης, στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε πως η υψηλή έκφραση της GPX1 συσχετίζεται με το στάδιο του ΔΝΚΚ [126]. Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη συσχετίστηκε η υψηλή έκφραση της GPX1 με την πρόοδο της νόσου σε ασθενείς με ΝΚΚ [119]. Σε μία μελέτη εντούτοις, αναφέρεται μειωμένη έκφραση GPX1 στο

85% των περιπτώσεων ΔΝΚΚ που μελετήθηκαν [125]. Τα διαφορετικά δεδομένα, τα οποία προφανώς οφείλονται σε διαφορετικές μεθόδους αξιολόγησης και διαφορετικά πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημικής μεθοδολογίας, θα ήταν σκόπιμο να μελετηθούν διεξοδικότερα σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, ενδεχομένως με συνδυασμό ανοσοϊστοχημικών και άλλων μεθοδολογιών.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση GPX3 σε όλα τα καρκινώματα της μελέτης μας. Με τη χρήση ημιποσοτικού υπολογισμού της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης, τα ΔΝΚΚ διακρίθηκαν σε εκείνα με υψηλή έκφραση (Histoscore>180) και σε καρκινώματα με χαμηλή έκφραση ((Histoscore<180). Στη συνέχεια αναζητήσαμε συσχετίσεις με τις διαθέσιμες κλινικοπαθολογοανατομικές πληροφορίες.

Στα ΔΝΚΚ της μελέτης μας η πρωτεΐνη GPX3 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρήνα των νεοπλασματικών κυττάρων στο 99% των περιπτώσεων. Συγκεκριμένα, κυτταροπλασματική εντόπιση της GPX-3 ανιχνεύθηκε στο 86.2% των περιπτώσεων ενώ στο 10,3% παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική και πυρηνική εντόπιση. Στις μελέτες σε ΔΝΚΚ καρκινώματα, αναφέρεται όπως και στη δική μας η κυτταροπλασματική εντόπιση της GPX3 [125,131].

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας είναι πως, σε αντίθεση με την GPX1, η υψηλότερη έκφραση της GPX3 συσχετίζεται, με χαμηλότερο βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης 1 και 2 κατά Fuhrman, ενώ φαίνεται πως η ανοσοϊστοχημική έκφραση της GPX3 μειώνεται σε καρκινώματα με υψηλό βαθμό 3 και 4 Fuhrman. Επίσης η χρώση ήταν έντονα θετική στα κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων του παρακείμενου μη-νεοπλασματικού νεφρικού παρεγχύματος. Αν και ο αριθμός καρκινωμάτων στη μελέτη μας είναι σχετικά περιορισμένος, ωστόσο τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα από προηγούμενες δημοσιεύσεις. Συγκεκριμένα οι Qianling Liu και συν. ανέδειξαν την ασθενή ανοσοϊστοχημική έκφραση σε 54 περιπτώσεις ΔΝΚΚ και την έντονη χρώση σε παρακείμενο μη νεοπλασματικό νεφρικό ιστό [131]. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η αρνητική ρύθμιση της GPX3 στο καρκίνωμα του νεφρού σε σύγκριση με τους παρακείμενους μη νεοπλασματικούς ιστούς, υποδηλώνει ενδεχομένως τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της [131].

Στην μελέτη των Rudenko et al. με τη χρήση γονιδιακής ανάλυσης SAGE αλλά και με ανοσοϊστοχημική μελέτη σε ιστικές μικροσυστοιχίες οι συγγραφείς έδειξαν πως η έκφραση της GPX3 ήταν μειωμένη σε όλα ΔΝΚΚ, καταλήγοντας πως η GPX3 εμπλέκεται στην ογκογένεση του ΔΝΚΚ [125,164]

Αν και η μειωμένη έκφραση της GPX3 μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της ογκογένεσης, της διήθησης και της μετάστασης σε ποικίλους όγκους [125], εντούτοις ο υποκείμενος μηχανισμός δεν είναι σαφής [122]. Αναστολή της έκφρασης GPX3 και ως συνέπεια της δραστηριότητας της πρωτεΐνης, ενδέχεται να

συσχετίζεται με την αναστολή της απόπτωσης καρκινικών κυττάρων όπως έχει αναφερθεί για παράδειγμα σε καρκινώματα του προστάτη ή του παχέος εντέρου [165]. Αντίθετα άλλοι συγγραφείς υποστηρίζουν πως η δράση της GPX3 προστατεύει τα νεοπλασματικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες με επακόλουθη επιδείνωση στη συνολική επιβίωση ασθενών με καρκίνωμα ωοθηκών [165]. Για τα ΔNKK δεν υπάρχουν ανάλογες μελέτες προς το παρόν. Η ανάλυση των δεδομένων από την έκφραση της GPX3 σε μεγάλες σειρές ΔNKK σε σχέση με κλινικές παραμέτρους, με την κλινική έκβαση, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη συνολική επιβίωση θα προσέφερε ενδεχομένως αξιολογικά και πιθανόν αξιοποιήσιμα κλινικά συμπεράσματα.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην ανοσοϊστοχημική έκφραση της GPX-3 και το φύλο, την ηλικία, την εντόπιση του όγκου ή με το μέγεθος του όγκου. Επιπλέον, δεν βρήκαμε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της GPX3 με τη διήθηση της νεφρικής φλέβας, την αγγειακή διήθηση και τη περιπυελική διήθηση του όγκου. Ανάλογα είναι τα ευρήματα από προηγούμενες δημοσιεύσεις στην μελέτη Qianling et al η μεθυλίωση GPX3 συσχετίστηκε σημαντικά με υψηλότερο πυρηνικό βαθμό όγκου RCC ($p = 0,014$), ενώ δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης και του φύλου, της ηλικίας, της θέσης του όγκου, του σταδίου TNM και του ιστολογικού τύπου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες GPX1 και GPX3 εκφράζονται στο διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα με διαφορετική κατανομή ανάμεσα σε καρκινώματα χαμηλού και υψηλού βαθμού πυρηνικής διαφοροποίησης Fuhrman. Επιπρόσθετα, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της GPX1 φαίνεται ότι συσχετίζεται με δυσμενείς για την πρόγνωση ιστοπαθολογικούς παράγοντες του ΔNKK ενώ η απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης GPX3 φαίνεται να συσχετίζεται με υψηλότερο βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης κατά Fuhrman. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος τους στην καρκινογένεση και στην πρόοδο της νεοπλασματικής νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος. Περαιτέρω μελέτες με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου των παραγόντων αυτών σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και αξιολόγηση περισσότερων κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων, θα μπορούσε να συνεισφέρει σε πληρέστερη αξιολόγηση του ρόλου των GPX στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού και να αναδείξει ενδεχομένως νεότερους πιθανούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς ιστοικούς βιοδείκτες.

V ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Tian ZH, Yuan C, Yang K, Gao XL. Systematic identification of key genes and pathways in clear cell renal cell carcinoma on bioinformatics analysis. *Ann Transl Med.* 2019 Mar;7 [5]:89. doi: 10.21037/atm.2019.01.18. PMID: 31019939; PMCID: PMC6462636.
- 2) Guo C, Xiong D, Yao X, Gu W, Zhang H, Yang B, Peng B, Liu M, Zheng J. Decreased SATB2 expression is associated with metastasis and poor prognosis in human clear cell renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Apr 1;8 [4]:3710-8. PMID: 26097552; PMCID: PMC4466939.
- 3) Selvi I, Demirci U, Bozdogan N, Basar H. The prognostic effect of immunoscore in patients with clear cell renal cell carcinoma: preliminary results. *Int Urol Nephrol.* 2020 Jan;52 [1]:21-34. doi: 10.1007/s11255-019-02285-0. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31541404.
- 4) Graves A, Hessamodini H, Wong G, Lim WH. Metastatic renal cell carcinoma: update on epidemiology, genetics, and therapeutic modalities. *Immunotargets Ther.* 2013 Jul 22;2:73-90. doi: 10.2147/ITT.S31426. PMID: 27471690; PMCID: PMC4928369.
- 5) Guo C, Zhao H, Wang Y, Bai S, Yang Z, Wei F, Ren X. Prognostic Value of the Neo-Immunoscore in Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2019 May 28;9:439. doi:10.3389/fonc.2019.00439. PMID: 31192136; PMCID: PMC6546810.
- 6) Carril-Ajuria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodriguez-Antona C, de Velasco G. Prognostic and Predictive Value of PBRM1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers [Basel].* 2019 Dec 19;12 [1]:16. doi: 10.3390/cancers12010016. PMID: 31861590; PMCID: PMC7016957.
- 7) Turajlic S, Swanton C, Boshoff C. Kidney cancer: The next decade. *J Exp Med.* 2018 Oct 1;215 [10]:2477-2479. doi: 10.1084/jem.20181617. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30217855; PMCID: PMC6170181.
- 8) Cojocaru E, Lozneanu L, Giușcă SE, Căruntu ID, Danciu M. Renal carcinogenesis -- insights into signaling pathways. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56 [1]:15-9. PMID: 25826482.
- 9) Clemmensen T, Matoso A, Graham T, Lai WS, Rais-Bahrami S, Gordetsky J. Pathologic and clinical characteristics of early onset renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2018 Apr;74:25-31. doi: 10.1016/j.humpath.2017.11.005. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29133143.

- 10) Costa WH, Jabboure G Netto, Cunha IW. Urological cancer related to familial syndromes. *Int Braz J Urol.* 2017 Mar-Apr;43 [2]:192-201. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0125. PMID: 27819754; PMCID: PMC5433356.
- 11) Akhtar M, Al-Bozom IA, Al Hussain T. Molecular and Metabolic Basis of Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Adv Anat Pathol.* 2018 May;25 [3]:189-196. doi: 10.1097/PAP.000000000000185. PMID: 29465421.
- 12) Perazella MA, Dreicer R, Rosner MH. Renal cell carcinoma for the nephrologist. *Kidney Int.* 2018 Sep;94 [3]:471-483. doi: 10.1016/j.kint.2018.01.023. Epub 2018 Apr 14. PMID: 29661544.
- 13) Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM. Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Mol Cancer Ther.* 2018 Jul;17 [7]:1355-1364. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1299. PMID: 29967214; PMCID: PMC6034114.
- 14) Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016 Jul;70 [1]:93-105. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029. Epub 2016 Feb 28. PMID: 26935559.
- 15) Dutcher JP. Update on the biology and management of renal cell carcinoma. *J Investig Med.* 2019 Jan;67 [1]:1-10. doi: 10.1136/jim-2018-000918. Epub 2018 Nov 18. PMID: 30455223.
- 16) Sean W, M.D, Clear cell renal cell carcinoma, PathologyOutlines.com, Inc. 2012.
- 17) Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, Gore JL, Sun M, Wood C, Russo P. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol.* 2019 Jan;75 [1]:74-84. doi: 10.1016/j.eururo.2018.08.036. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30243799.
- 18) Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, Grünwald V, Gillessen S, Horwich A; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2019 May 1;30 [5]:706-720. doi: 10.1093/annonc/mdz056. PMID: 30788497.
- 19) Navai N, Wood CG. Environmental and modifiable risk factors in renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2012 Mar-Apr;30 [2]:220-4. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.10.001. PMID: 22385993.
- 20) Aurilio G, Piva F, Santoni M, Cimadamore A, Sorgentoni G, Lopez-Beltran A, Cheng L, Battelli N, Nolè F, Montironi R. The Role of Obesity in Renal Cell Carcinoma

- Patients: Clinical-Pathological Implications. Int J Mol Sci. 2019 Nov 13;20 [22]:5683. doi: 10.3390/ijms20225683. PMID: 31766196; PMCID: PMC6888048.**
- 21) Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V. Renal cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers. 2017 Mar 9;3:17009. doi: 10.1038/nrdp.2017.9. PMID: 28276433; PMCID: PMC5936048.**
 - 22) Washio M, Mori M, Mikami K, Miki T, Watanabe Y, Nakao M, Kubo T, Suzuki K, Ozasa K, Wakai K, Tamakoshi A. Risk factors for renal cell carcinoma in a Japanese population. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15 [21]:9065-70. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.21.9065. PMID: 25422180.**
 - 23) Amling CL. The association between obesity and the progression of prostate and renal cell carcinoma. Urol Oncol. 2004 Nov-Dec;22 [6]:478-84. doi: 10.1016/j.urolonc.2004.10.004. PMID: 15610865.**
 - 24) Song DY, Song S, Song Y, Lee JE. Alcohol intake and renal cell cancer risk: a meta-analysis. Br J Cancer. 2012 May 22;106 [11]:1881-90. doi: 10.1038/bjc.2012.136. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22516951; PMCID: PMC3364130.**
 - 25) Karami S, Daugherty SE, Purdue MP. A prospective study of alcohol consumption and renal cell carcinoma risk. Int J Cancer. 2015 Jul 1;137 [1]:238-42. doi: 10.1002/ijc.29359. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25431248; PMCID: PMC4405442.**
 - 26) Hu J, Mao Y, DesMeules M, Csizmadia I, Friedenreich C, Mery L; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Total fluid and specific beverage intake and risk of renal cell carcinoma in Canada. Cancer Epidemiol. 2009 Nov;33 [5]:355-62. doi: 10.1016/j.canep.2009.10.004. Epub 2009 Nov 7. PMID: 19896918.**
 - 27) Colt JS, Schwartz K, Graubard BI, Davis F, Ruterbusch J, DiGaetano R, Purdue M, Rothman N, Wacholder S, Chow WH. Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans. Epidemiology. 2011 Nov;22 [6]:797-804. doi: 10.1097/EDE.0b013e3182300720. PMID: 21881515; PMCID: PMC3188386.**
 - 28) Weikert S, Ljungberg B. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. World J Urol. 2010 Jun;28 [3]:247-52. doi: 10.1007/s00345-010-0555-1. PMID: 20390283.**
 - 29) Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, O'Corragain OA, Edmonds PJ, Ungprasert P, Kittanamongkolchai W, Erickson SB. The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: a systematic review and meta-analysis. QJM. 2015 Mar;108 [3]:205-12. doi: 10.1093/qjmed/hcu195. Epub 2014 Sep 9. PMID: 25208892.**

- 30) Joh HK, Willett WC, Cho E. Type 2 diabetes and the risk of renal cell cancer in women. *Diabetes Care*. 2011 Jul;34 [7]:1552-6. doi: 10.2337/dc11-0132. Epub 2011 May 20. PMID: 21602426; PMCID: PMC3120193.
- 31) Hu SL. The Nephrologist's Management of Renal Cell Carcinoma After Kidney Surgery. *Semin Nephrol*. 2020 Jan;40 [1]:59-68. doi: 10.1016/j.semnephrol.2019.12.007. PMID: 32130967.
- 32) Kabat GC, Silvera SA, Miller AB, Rohan TE. A cohort study of reproductive and hormonal factors and renal cell cancer risk in women. *Br J Cancer*. 2007 Mar 12;96 [5]:845-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6603629. Epub 2007 Feb 20. PMID: 17311018; PMCID: PMC2360073.
- 33) Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castelao JE, Ross RK, Yu MC. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1999 Oct;81 [3]:542-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6690728. PMID: 10507783; PMCID: PMC2362920.
- 34) Karami S, Daughtery SE, Schwartz K, Davis FG, Ruterbusch JJ, Wacholder S, Graubard BI, Berndt SI, Hofmann JN, Purdue MP, Moore LE, Colt JS. Analgesic use and risk of renal cell carcinoma: A case-control, cohort and meta-analytic assessment. *Int J Cancer*. 2016 Aug 1;139 [3]:584-92. doi: 10.1002/ijc.30108. Epub 2016 Apr 9. PMID: 27009534; PMCID: PMC6896985.
- 35) Lipworth L, Tarone RE, Lund L, McLaughlin JK. Epidemiologic characteristics and risk factors for renal cell cancer. *Clin Epidemiol*. 2009 Aug 9;1:33-43. doi: 10.2147/cep.s4759. PMID: 20865085; PMCID: PMC2943168.
- 36) Yim K, Bindayi A, McKay R, Mehrazin R, Raheem OA, Field C, Bloch A, Wake R, Ryan S, Patterson A, Derweesh IH. Rising Serum Uric Acid Level Is Negatively Associated with Survival in Renal Cell Carcinoma. *Cancers [Basel]*. 2019 Apr 15;11 [4]:536. doi: 10.3390/cancers11040536. PMID: 30991671; PMCID: PMC6520981.
- 37) Golka K, Wiese A, Assennato G, Bolt HM. Occupational exposure and urological cancer. *World J Urol*. 2004 Feb;21 [6]:382-91. doi: 10.1007/s00345-003-0377-5. Epub 2003 Nov 26. PMID: 14648102.
- 38) Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2010 May;7 [5]:245-57. doi: 10.1038/nrurol.2010.46. PMID: 20448658; PMCID: PMC3012455.
- 39) Rossi SH, Prezzi D, Kelly-Morland C, Goh V. Imaging for the diagnosis and response assessment of renal tumours. *World J Urol*. 2018 Dec;36 [12]:1927-1942. doi: 10.1007/s00345-018-2342-3. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29948048; PMCID: PMC6280818.

- 40) Ljungberg B. (Chair), Albiges L., Bensalah K., Bex A. (Vice-chair), Giles R.H. (Patient Advocate), Hora M., Kuczyk M.A., Lam T., Marconi L., Merseburger A.S., Powles T., Staehler M., Volpe A. Guidelines Associates: Abu-Ghanem Y., Dabestani S., Fernández-Pello Montes S., Hofmann F., Kuusk T., Tahbaz R., Renal Cell Carcinoma, European Association of Urology (EAU) oncology Guidelines. Ημερ. Πρόσβ.: 14/8/2020 από: <https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma>
- 41) Klatte T, Stewart GD. Renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol.* 2018 Dec;36 [12]:1889-1890. doi: 10.1007/s00345-018-2490-5. PMID: 30209553.
- 42) Diaz de Leon A, Pedrosa I. Imaging and Screening of Kidney Cancer. *Radiol Clin North Am.* 2017 Nov;55 [6]:1235-1250. doi: 10.1016/j.rcl.2017.06.007. PMID: 28991563; PMCID: PMC5669050.
- 43) Liu Y, Cheng G, Song Z, Xu T, Ruan H, Cao Q, Wang K, Bao L, Liu J, Zhou L, Liu D, Yang H, Chen K, Zhang X. RAC2 acts as a prognostic biomarker and promotes the progression of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2019 Sep;55 [3]:645-656. doi: 10.3892/ijo.2019.4849. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31364727; PMCID: PMC6685597.
- 44) Kuhn E, De Anda J, Manoni S, Netto G, Rosai J. Renal cell carcinoma associated with prominent angioleiomyoma-like proliferation. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1372
- 45) Shannon BA, Cohen RJ, Segal A, Baker EG, Murch AR. Clear cell renal cell carcinoma with smooth muscle stroma. *Hum Pathol* 2009;40:425
- 46) Gobbo S, Eble JN, Maclennan GT, Grignon DJ, Shah RB, Zhang S, Martignoni G, Brunelli M, Cheng L. Renal cell carcinomas with papillary architecture and clear cell components: the utility of immunohistochemical and cytogenetical analyses in differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:1780.
- 47) Reuter VE, Argani P, Zhou M, Delahunt B; Members of the ISUP Immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the kidney tumors: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol* 2014 Aug;38(8):e35-49
- 48) Sangoi AR, Karamchandani J, Kim J, Pai RK, McKenney JK. The use of immunohistochemistry in the diagnosis of metastatic clear cell renal cell carcinoma: a review of PAX-8, PAX-2, hKIM-1, RCCma, and CD10. *Adv Anat Pathol.* 2010 Nov;17(6):377-93. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181f89400. PMID: 20966644.
- 49) Swami U, Nussenzeig RH, Haaland B, Agarwal N. Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Ann Transl Med.* 2019

- Mar;7 [Suppl 1]:S18. doi: 10.21037/atm.2019.01.50. PMID: 31032299; PMCID: PMC6462602.
- 50) Dunnick NR. Renal cell carcinoma: staging and surveillance. *Abdom Radiol [NY]*. 2016 Jun;41 [6]:1079-85. doi: 10.1007/s00261-016-0692-0. PMID: 26971340.
- 51) EIKONA 1.3: Renal Cell Carcinoma, Staging, Patient Resource. Ημερ. Προσβ.: 1/11/2020 από: https://www.patientresource.com/RCC_Staging.aspx
- 52) Brett Delahunt¹, John C Cheville, Guido Martignoni, Peter A Humphrey, Cristina Magi-Galluzzi, Jesse McKenney, Lars Egevad, Ferran Algaba, Holger Moch, David J Grignon, Rodolfo Montironi, John R Srigley, *The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. Am J Surg Pathol* 2013 Oct;37(10):1490-504.
- 53) Rini, Brian I; Campbell, Steven C; Escudier, Bernard (2009). "Renal cell carcinoma". *The Lancet*. 373 (9669): 1119–1132.
- 54) Ivan D, Fang F. Cancer Grading Manual, springer science+business media LCC, 2007
- 55) Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Samaratunga H. Grading of renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2019 Jan;74 [1]:4-17. doi: 10.1111/his.13735. PMID: 30565310.
- 56) Sanchez DJ, Simon MC. Genetic and metabolic hallmarks of clear cell renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018 Aug;1870 [1]:23-31. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.06.003. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29959988; PMCID: PMC6561085.
- 57) Mitchell TJ, Rossi SH, Klatte T, Stewart GD. Genomics and clinical correlates of renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2018 Dec;36 [12]:1899-1911. doi: 10.1007/s00345-018-2429-x. Epub 2018 Aug 11. PMID: 30099580; PMCID: PMC6280817.
- 58) Hsieh JJ, Le VH, Oyama T, Ricketts CJ, Ho TH, Cheng EH. Chromosome 3p Loss-Orchestrated VHL, HIF, and Epigenetic Deregulation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2018 Oct 29;36 [36]:JCO2018792549. doi: 10.1200/JCO.2018.79.2549. Epub ahead of print. PMID: 30372397; PMCID: PMC6299341.
- 59) Liu L, Guo R, Zhang X, Liang Y, Kong F, Wang J, Xu Z. Loss of SETD2, but not H3K36me3, correlates with aggressive clinicopathological features of clear cell renal cell carcinoma patients. *Biosci Trends*. 2017 May 23;11 [2]:214-220. doi: 10.5582/bst.2016.01228. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28260718.
- 60) VHL von Hippel-Lindau tumor suppressor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (nih.gov), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7428>

- 61) Li QK, Pavlovich CP, Zhang H, Kinsinger CR, Chan DW. Challenges and opportunities in the proteomic characterization of clear cell renal cell carcinoma [ccRCC]: A critical step towards the personalized care of renal cancers. *Semin Cancer Biol.* 2019 Apr;55:8-15. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.004. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30055950; PMCID: PMC6624650.
- 62) Ishimaru T. Molecular Components of the RCC Grade. *Semin Nephrol.* 2020 Jan;40 [1]:14-27. doi: 10.1016/j.semnephrol.2019.12.003. PMID: 32130962.
- 63) Kluzek K, Bluysen HA, Wesoly J. The epigenetic landscape of clear-cell renal cell carcinoma. *J Kidney Cancer VHL.* 2015 May 28;2 [3]:90-104. doi: 10.15586/jkcvhl.2015.33. PMID: 28326264; PMCID: PMC5345536.
- 64) Nargund AM, Pham CG, Dong Y, Wang PI, Osmangeyoglu HU, Xie Y, Aras O, Han S, Oyama T, Takeda S, Ray CE, Dong Z, Berge M, Hakimi AA, Monette S, Lekaye CL, Koutcher JA, Leslie CS, Creighton CJ, Weinhold N, Lee W, Tickoo SK, Wang Z, Cheng EH, Hsieh JJ. The SWI/SNF Protein PBRM1 Restrains VHL-Loss-Driven Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep.* 2017 Mar 21;18 [12]:2893-2906. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.074. PMID: 28329682; PMCID: PMC5431084.
- 65) PBRM1 polybromo 1 (Homo sapiens (human)), Gene, NCBI (nih.gov), Gene ID:55193. Ημερ. Πρόσβ.: 16/1/2021, από: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55193>
- 66) da Costa WH, Fares AF, Bezerra SM, Morini MA, de Toledo Benigno LA, Clavijo DA, Fornazieri L, Rocha MM, da Cunha IW, de Cassio Zequi S. Loss of BAP1 expression in metastatic tumor tissue is an event of poor prognosis in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2019 Jan;37 [1]:78-85. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.10.017. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30446457.
- 67) Liu W, Fu Q, An H, Chang Y, Zhang W, Zhu Y, Xu L, Xu J. Decreased Expression of SETD2 Predicts Unfavorable Prognosis in Patients With Nonmetastatic Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2015 Nov;94(45):e2004. doi: 10.1097/MD.0000000000002004. PMID: 26559293; PMCID: PMC4912287.
- 68) SETD2 SET domain containing 2, histone lysine methyltransferase (Homo sapiens (human)), Gene - NCBI (nih.gov). Gene ID: 29072. Ημερ. Πρόσβ.: 16/1/2021 από: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29072>
- 69) Liu J, Hanavan PD, Kras K, Ruiz YW, Castle EP, Lake DF, Chen X, O'Brien D, Luo H, Robertson KD, Gu H, Ho TH. Loss of SETD2 Induces a Metabolic Switch in Renal Cell Carcinoma Cell Lines toward Enhanced Oxidative Phosphorylation. *J Proteome*

- Res. 2019 Jan 4;18 [1]:331-340. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00628. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30406665; PMCID: PMC6465098.
- 70) Wang J, Wen J, Yi R, Liu F, Zhou J, Liu G, Li Q, Yang Z, Su X. High selectivity of PI3K β inhibitors in SETD2-mutated renal clear cell carcinoma. *J BUON*. 2015 Sep-Oct;20 [5]:1267-75. PMID: 26537074.
- 71) Walpole S, Pritchard AL, Cebulla CM, Pilarski R, Stautberg M, Davidorf FH, de la Fouchardière A, Cabaret O, Golmard L, Stoppa-Lyonnet D, Garfield E, Njauw CN, Cheung M, Turunen JA, Repo P, Järvinen RS, van Doorn R, Jager MJ, Luyten GPM, Marinkovic M, Chau C, Potrony M, Höiom V, Helgadottir H, Pastorino L, Bruno W, Andreotti V, Dalmaso B, Ciccarese G, Queirolo P, Mastracci L, Wadt K, Kiilgaard JF, Speicher MR, van Poppelen N, Kilic E, Al-Jamal RT, Dianzani I, Betti M, Bergmann C, Santagata S, Dahiya S, Taibjee S, Burke J, Poplawski N, O'Shea SJ, Newton-Bishop J, Adlard J, Adams DJ, Lane AM, Kim I, Klebe S, Racher H, Harbour JW, Nickerson ML, Murali R, Palmer JM, Howlie M, Symmons J, Hamilton H, Warriar S, Glasson W, Johansson P, Robles-Espinoza CD, Ossio R, de Klein A, Puig S, Ghiorzo P, Nielsen M, Kivelä TT, Tsao H, Testa JR, Gerami P, Stern MH, Paillerets BB, Abdel-Rahman MH, Hayward NK. Comprehensive Study of the Clinical Phenotype of Germline BAP1 Variant-Carrying Families Worldwide. *J Natl Cancer Inst*. 2018 Dec 1;110 [12]:1328-1341. doi: 10.1093/jnci/djy171. PMID:30517737; PMCID: PMC6292796.
- 72) Hu SL, Chang A, Perazella MA, Okusa MD, Jaimes EA, Weiss RH; American Society of Nephrology Onco-Nephrology Forum. The Nephrologist's Tumor: Basic Biology and Management of Renal Cell Carcinoma. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Aug;27 [8]:2227-37. doi: 10.1681/ASN.2015121335. Epub 2016 Mar 9. PMID: 26961346; PMCID: PMC4978061.
- 73) Guo H, German P, Bai S, Barnes S, Guo W, Qi X, Lou H, Liang J, Jonasch E, Mills GB, Ding Z. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J Genet Genomics*. 2015 Jul 20;42 [7]:343-53. doi: 10.1016/j.jgg.2015.03.003. Epub 2015 Mar 19. PMID: 26233890; PMCID: PMC4624215.
- 74) Kumar A, Kumari N, Gupta V, Prasad R. Renal Cell Carcinoma: Molecular Aspects. *Indian J Clin Biochem*. 2018 Jul;33 [3]:246-254. doi: 10.1007/s12291-017-0713-y. Epub 2017 Nov 13. PMID: 30072823; PMCID: PMC6052717.
- 75) Sun J, Xie L, Lv J, Zhang W, Lv J, Liang Y, Geng Y, Li X. Inhibitor of growth 4 inhibits cell proliferation, migration, and induces apoptosis of renal cell

- carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 2019 Apr;120 [4]:6709-6717. doi: 10.1002/jcb.27967. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30390334.
- 76) Pal SK, Quinn DI. Differentiating mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2013 Nov;39 [7]:709-19. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.12.015. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23433636; PMCID: PMC4957946.
- 77) Miyata Y, Matsuo T, Sagara Y, Ohba K, Ohyama K, Sakai H. A Mini-Review of Reactive Oxygen Species in Urological Cancer: Correlation with NADPH Oxidases, Angiogenesis, and Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 22;18 [10]:2214. doi: 10.3390/ijms18102214. PMID: 29065504; PMCID: PMC5666894.
- 78) Banjac L, Banjac G, Kotur-Stevuljević J, Spasojević-Kalimanovska V, Gojković T, Bogavac-Stanojević N, Jelić-Ivanović Z, Banjac G. PRO-OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS IN RETINOPATHY OF PREMATURITY. *Acta Clin Croat.* 2018 Sep;57 [3]:458-463. doi: 10.20471/acc.2018.57.03.08. PMID: 31168178; PMCID: PMC6536293.
- 79) Collery P. Strategies for the development of selenium-based anticancer drugs. *J Trace Elem Med Biol.* 2018 Dec;50:498-507. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.02.024. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29548612.
- 80) Abu Aboud O, Habib SL, Trott J, Stewart B, Liang S, Chaudhari AJ, Sutcliffe J, Weiss RH. Glutamine Addiction in Kidney Cancer Suppresses Oxidative Stress and Can Be Exploited for Real-Time Imaging. *Cancer Res.* 2017 Dec1;77 [23]:6746-6758. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0930. Epub 2017 Oct 11. PMID: 29021138; PMCID: PMC5791889.
- 81) Lasseigne BN, Brooks JD. The Role of DNA Methylation in Renal Cell Carcinoma. *Mol Diagn Ther.* 2018 Aug;22 [4]:431-442. doi: 10.1007/s40291-018-0337-9. PMID: 29777398; PMCID: PMC6088752.
- 82) Xiao Y, Meierhofer D. Glutathione Metabolism in Renal Cell Carcinoma Progression and Implications for Therapies. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 26;20 [15]:3672. doi: 10.3390/ijms20153672. PMID: 31357507; PMCID: PMC6696504.
- 83) Frederiks WM, Bosch KS, Hoeben KA, van Marle J, Langbein S. Renal cell carcinoma and oxidative stress: The lack of peroxisomes. *Acta Histochem.* 2010 Jul;112 [4]:364-71. doi: 10.1016/j.acthis.2009.03.003. Epub 2009 Jun 4. PMID: 19500819.
- 84) Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, Liang X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.*

- 2018 Nov 1;37 [1]:266. doi: 10.1186/s13046-018-0909-x. PMID: 30382874; PMCID: PMC6211502.
- 85) Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species [ROS] and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2017 Feb 28;387:95-105. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.042. Epub 2016 Mar 29. PMID: 27037062.
- 86) de Sá Junior PL, Câmara DAD, Porcacchia AS, Fonseca PMM, Jorge SD, Araldi RP, Ferreira AK. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:2467940. doi: 10.1155/2017/2467940. Epub 2017 Oct 16. PMID:29123614; PMCID: PMC5662836.
- 87) Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4350965. doi: 10.1155/2016/4350965. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26998193; PMCID: PMC4779832.
- 88) Rodic S, Vincent MD. Reactive oxygen species [ROS] are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *Int J Cancer.* 2018 Feb 1;142 [3]:440-448. doi: 10.1002/ijc.31069. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28940517.
- 89) Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019 Jul;25:101084. doi: 10.1016/j.redox.2018.101084. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30612957; PMCID: PMC6859528.
- 90) Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2020 Jun;30 [6]:440-451. doi: 10.1016/j.tcb.2020.03.002. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32303435.
- 91) Santos C, Pires Mdos A, Santos D, Payan-Carreira R. Distribution of superoxide dismutase 1 and glutathione peroxidase 1 in the cyclic canine endometrium. *Theriogenology.* 2016 Aug;86 [3]:738-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.027. Epub 2016 Mar 8. PMID: 27114170.
- 92) Zhang ML, Wu HT, Chen WJ, Xu Y, Ye QQ, Shen JX, Liu J. Involvement of glutathione peroxidases in the occurrence and development of breast cancers. *J Transl Med.* 2020 Jun 22;18 [1]:247. doi: 10.1186/s12967-020-02420-x. PMID: 32571353; PMCID: PMC7309991.
- 93) Ismail T, Kim Y, Lee H, Lee DS, Lee HS. Interplay Between Mitochondrial Peroxiredoxins and ROS in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 7;20 [18]:4407. doi: 10.3390/ijms20184407. PMID: 31500275; PMCID: PMC6770548.

- 94) Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014 May 19;24 [10]:R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034. PMID: 24845678; PMCID: PMC4055301.
- 95) Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K, Yang GM, Dayem AA, Cho SG. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 17;18 [7]:1544. doi: 10.3390/ijms18071544. PMID:28714931; PMCID: PMC5536032.
- 96) Aldemir M, Karaguzel E, Okulu E, Gudeloglu A, Ener K, Ozayar A, Erel O. Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with renal cell carcinoma. *Cent European J Urol.* 2015;68 [4]:415-20. doi: 10.5173/ceju.2015.656. Epub 2015 Nov 23. PMID: 26855793; PMCID: PMC4742443.
- 97) Bułdak RJ, Bułdak Ł, Kukla M, Gabriel A, Zwirska-Korczala K. Significance of selected antioxidant enzymes in cancer cell progression. *Pol J Pathol.*2014 Oct;65 [3]:167-75. doi: 10.5114/pjp.2014.45779. PMID: 25372413.
- 98) Santos C, Pires Mdos A, Santos D, Payan-Carreira R. Distribution of superoxide dismutase 1 and glutathione peroxidase 1 in the cyclic canine endometrium. *Theriogenology.* 2016 Aug;86 [3]:738-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.027. Epub 2016 Mar 8. PMID: 27114170.
- 99) Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015 Jun 5;97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25942353.
- 100) Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 2018 Mar;63 [1]:68-78. doi: 10.1016/j.advms.2017.05.005. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28822266.
- 101) Jakubczyk K, Kałduńska J, Dec K, Kawczuga D, Janda K. Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. *Pol Merkur Lekarski.* 2020Apr 22;48 [284]:128-132. PMID: 32352947.
- 102) Pavlović I, Pejić S, Radojević-Škodrić S, Todorović A, Stojiljković V, Gavrilović L, Popović N, Basta-Jovanović G, Džamić Z, Pajović SB. The effect of antioxidant status on overall survival in renal cell carcinoma. *Arch Med Sci.* 2019 Jul 22;16 [1]:94-101. doi: 10.5114/aoms.2019.86818. PMID: 32051711; PMCID: PMC6963148
- 103) Chen B, Shen Z, Wu D, Xie X, Xu X, Lv L, Dai H, Chen J, Gan X. Glutathione Peroxidase 1 Promotes NSCLC Resistance to Cisplatin via ROS-Induced

- Activation of PI3K/AKT Pathway. *Biomed Res Int.* 2019 Mar 27;2019:7640547. doi: 10.1155/2019/7640547. PMID: 31032363; PMCID: PMC6457285.
- 104) Hsueh YM, Lin YC, Huang YL, Shiue HS, Pu YS, Huang CY, Chung CJ. Effect of plasma selenium, red blood cell cadmium, total urinary arsenic levels, and eGFR on renal cell carcinoma. *Sci Total Environ.* 2020 Aug 6;750:141547. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141547. Epub ahead of print. PMID: 32858293.
- 105) Steinbrenner H, Speckmann B, Klotz LO. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Arch Biochem Biophys.* 2016 Apr 1;595:113-9. doi: 10.1016/j.abb.2015.06.024. PMID: 27095226.
- 106) Akahoshi N, Anan Y, Hashimoto Y, Tokoro N, Mizuno R, Hayashi S, Yamamoto S, Shimada KI, Kamata S, Ishii I. Dietary selenium deficiency or selenomethionine excess drastically alters organ selenium contents without altering the expression of most selenoproteins in mice. *J Nutr Biochem.* 2019 Jul;69:120-129. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.03.020. Epub 2019 Apr 8. PMID: 31078905.
- 107) Benstoem C, Goetzenich A, Kraemer S, Borosch S, Manzanares W, Hardy G, Stoppe C. Selenium and its supplementation in cardiovascular disease--what do we know? *Nutrients.* 2015 Apr 27;7(5):3094-118. doi: 10.3390/nu7053094. PMID: 25923656; PMCID: PMC4446741.
- 108) Combs GF Jr. Biomarkers of selenium status. *Nutrients.* 2015 Mar 31;7 [4]:2209-36. doi: 10.3390/nu7042209. PMID: 25835046; PMCID: PMC4425141.
- 109) Tinkov AA, Ajsuvakova OP, Filippini T, Zhou JC, Lei XG, Gatiatulina ER, Michalke B, Skalnaya MG, Vinceti M, Aschner M, Skalny AV. Selenium and Selenoproteins in Adipose Tissue Physiology and Obesity. *Biomolecules.* 2020 Apr 24;10 [4]:658. doi: 10.3390/biom10040658. PMID: 32344656; PMCID: PMC7225961.
- 110) Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003 May-Jun;57 [3-4]:134-44. doi:10.1016/s0753-3322 [03]00035-0. PMID: 12818475; PMCID: PMC6361120.
- 111) Qazi IH, Angel C, Yang H, Zoidis E, Pan B, Wu Z, Ming Z, Zeng CJ, Meng Q, Han H, Zhou G. Role of Selenium and Selenoproteins in Male Reproductive Function: A Review of Past and Present Evidences. *Antioxidants [Basel].* 2019 Aug 2;8 [8]:268. doi: 10.3390/antiox8080268. PMID: 31382427; PMCID: PMC6719970.
- 112) Gladyshev VN, Arnér ES, Berry MJ, Brigelius-Flohé R, Bruford EA, Burk RF, Carlson BA, Castellano S, Chavatte L, Conrad M, Copeland PR, Diamond AM, Driscoll DM, Ferreiro A, Flohé L, Green FR, Guigó R, Handy DE, Hatfield DL, Hesketh J, Hoffmann PR, Holmgren A, Hondal RJ, Howard MT, Huang K, Kim HY,

- Kim IY, Köhrle J, Krol A, Kryukov GV, Lee BJ, Lee BC, Lei XG, Liu Q, Lescure A, Lobanov AV, Loscalzo J, Maiorino M, Mariotti M, Sandeep Prabhu K, Rayman MP, Rozovsky S, Salinas G, Schmidt EE, Schomburg L, Schweizer U, Simonović M, Sunde RA, Tsuji PA, Tweedie S, Ursini F, Whanger PD, Zhang Y. Selenoprotein Gene Nomenclature. *J Biol Chem.* 2016 Nov 11;291 [46]:24036-24040. doi: 10.1074/jbc.M116.756155. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27645994; PMCID: PMC5104929.
- 113) Vindry C, Ohlmann T, Chavatte L. Translation regulation of mammalian selenoproteins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018 Nov;1862 [11]:2480-2492. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.05.010. Epub 2018 May 9. PMID: 29751099.
- 114) Méplan C, Hesketh J. The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk. *Mutagenesis.* 2012 Mar;27 [2]:177-86. doi: 10.1093/mutage/ger058. PMID: 22294765.
- 115) Brigelius-Flohé R, Kipp AP. Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jul;1259:19-25. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06574.x. PMID: 22758632.
- 116) Brigelius-Flohé R, Müller C, Menard J, Florian S, Schmehl K, Wingler K. Functions of GI-GPx: lessons from selenium-dependent expression and intracellular localization. *Biofactors.* 2001;14(1-4):101-6. doi: 10.1002/biof.5520140114. PMID: 11568446.
- 117) Xianyong Ma, Dun Deng and Weidong Chen, Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT, *intech open scienc*, 2017, *Enzyme Inhibitors and Activators*, chapter 9, <http://dx.doi.org/10.5772/65936>
- 118) Müller C, Wingler K, Brigelius-Flohé R. 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol Chem.* 2003 Jan;384(1):11-8. doi: 10.1515/BC.2003.002. PMID: 12674495.
- 119) Wei R, Qiu H, Xu J, Mo J, Liu Y, Gui Y, Huang G, Zhang S, Yao H, Huang X, Gan Z. Expression and prognostic potential of GPX1 in human cancers based on data mining. *Ann Transl Med.* 2020 Feb;8 [4]:124. doi: 10.21037/atm.2020.02.36. PMID: 32175417; PMCID: PMC7049064.
- 120) Jiao Y, Wang Y, Guo S, Wang G. Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget.* 2017 Aug 16;8 [45]:80093-80102. doi: 10.18632/oncotarget.20278. PMID: 29108391; PMCID: PMC5668124.

- 121) Kipp AP. Selenium-Dependent Glutathione Peroxidases During Tumor Development. *Adv Cancer Res.* 2017;136:109-138. doi: 10.1016/bs.acr.2017.07.004. Epub 2017 Aug 23. PMID: 29054415.
- 122) Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830 [5]:3289-303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23201771.
- 123) GPX1 Gene, Genecards, THE HUMAN GENE DATABASE, ημερ. Πρόσβ. 1/10/20 από :[GPX1 Gene - GeneCards | GPX1 Protein | GPX1 Antibody](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1), <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1>
- 124) Zhang Q, Xu H, You Y, Zhang J, Chen R. High Gpx1 expression predicts poor survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2018 Feb;45 [1]:13-19. doi: 10.1016/j.anl.2017.05.012. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28641905.
- 125) Rudenko E, Kondratov O, Gerashchenko G, Lapska Y, Kravchenko S, Koliada O, Voizianov S, Zgonnyk Y, Kashuba V. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas. *Exp Oncol.* 2015 Jun;37 [2]:105-10. PMID: 26112936.
- 126) Cheng Y, Xu T, Li S, Ruan H. GPX1, a biomarker for the diagnosis and prognosis of kidney cancer, promotes the progression of kidney cancer. *Aging [Albany NY].* 2019 Dec 16;11 [24]:12165-12176. doi: 10.18632/aging.102555. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31844035; PMCID: PMC6949109.
- 127) Stolwijk JM, Falls-Hubert KC, Searby CC, Wagner BA, Buettner GR. Simultaneous detection of the enzyme activities of GPx1 and GPx4 guide optimization of selenium in cell biological experiments. *Redox Biol.* 2020 May;32:101518. doi: 10.1016/j.redox.2020.101518. Epub 2020 Mar 29. PMID: 32278283; PMCID: PMC7150527.
- 128) GPX2 glutathione peroxidase 2 (Homo sapiens (human)), Gene, NCBI (nih.gov), gene ID: 2877. Ημερ. Πρόσβ.: 12/12/2020 από: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2877>
- 129) GPX3 Gene, GeneCards, THE HUMAN GENE DATABASE. Ημερ. Πρόσβ.: 1/10/2020 από: [GPX3 Gene - GeneCards | GPX3 Protein | GPX3 Antibody](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX3) <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX3>.
- 130) GPX3 glutathione peroxidase 3 (Homo sapiens (human)), Gene, NCBI (nih.gov), Gene ID: 2878. Ημερ. Πρόσβ.: 10/10/2020 από: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2878>

- 131) Liu Q, Jin J, Ying J, Sun M, Cui Y, Zhang L, Xu B, Fan Y, Zhang Q. Frequent epigenetic suppression of tumor suppressor gene glutathione peroxidase 3 by promoter hypermethylation and its clinical implication in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2015 May 11;16 [5]:10636-49. doi: 10.3390/ijms160510636. PMID: 25970749; PMCID: PMC4463666.
- 132) Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1790 [11]:1555-68. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.006. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19289149.
- 133) Tsubouchi K, Araya J, Yoshida M, Sakamoto T, Koumura T, Minagawa S, Hara H, Hosaka Y, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S, Fujita Y, Utsumi H, Hashimoto M, Wakui H, Numata T, Kaneko Y, Mori S, Asano H, Matsudaira H, Ohtsuka T, Nakayama K, Nakanishi Y, Imai H, Kuwano K. Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *J Immunol.* 2019 Oct 15;203 [8]:2076-2087. doi: 10.4049/jimmunol.1801232. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31534007.
- 134) Shin D, Kim EH, Lee J, Roh JL. Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer. *Free Radic Biol Med.* 2018 Dec;129:454-462. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.426. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30339884.
- 135) GPX4 glutathione peroxidase 4 (Homo sapiens (human)), NCBI, gene, Gene ID: 2879 . Ημερ. Πρόσβ.: 12/12/2020, από : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2879>
- 136) GPX5 glutathione peroxidase 5 (Homo sapiens (Human)), NCBI, gene, Gene ID: 2880. Ημερ. Πρόσβ.12/12/2020 από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2880#gene-expression>
- 137) Théophile Mbemba Fundu, Paulin Mutwale Kapepula, Justin Mboloko Esimo, José Remacle and Nadege Kabamba Ngombe, Subcellular Localization of Glutathione Peroxidase, Change in Glutathione System during Ageing and Effects on Cardiometabolic Risks and Associated Diseases, *intechopen*, Chapter , Glutathione Peroxidase in Health and Disease, October 2019 DOI: 10.5772/intechopen.89384.
- 138) GPX6 glutathione peroxidase 6 (Homo sapiens (human)), NCBI gene, ημερ. Πρόσβ. 12/12/2020 από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/257202>.
- 139) Peng D, Belkhiri A, Hu T, Chaturvedi R, Asim M, Wilson KT, Zaika A, El-Rifai W. Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in

oesophageal

cells. *Gut*. 2012 Sep;61 [9]:1250-60. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301078. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22157330; PMCID: PMC3419307.

- 140) Peng DF, Hu TL, Soutto M, Belkhiri A, El-Rifai W. Loss of glutathione peroxidase 7 promotes TNF- α -induced NF- κ B activation in Barrett's carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2014 Jul;35 [7]:1620-8. doi: 10.1093/carcin/bgu083. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24692067; PMCID: PMC4076814.
- 141) Min SY, Kim HS, Jung EJ, Jung EJ, Jee CD, Kim WH. Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 [GPX1] down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer. *Anticancer Res*. 2012 Aug;32 [8]:3169-75. PMID: 22843889.
- 142) Yagublu V, Arthur JR, Babayeva SN, Nicol F, Post S, Keese M. Expression of selenium-containing proteins in human colon carcinoma tissue. *Anticancer Res*. 2011 Sep;31 [9]:2693-8. PMID: 21868509.
- 143) Lee JR, Roh JL, Lee SM, Park Y, Cho KJ, Choi SH, Nam SY, Kim SY. Overexpression of glutathione peroxidase 1 predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017 Nov;143 [11]:2257-2265. doi: 10.1007/s00432-017-2466-7. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28653098.
- 144) Lin Y, Zhang Y, Chen Y, Liu Z. Promoter methylation and clinical significance of GPX3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2019 Nov;215 [11]:152676. doi: 10.1016/j.prp.2019.152676. Epub 2019 Sep 27. PMID: 31610903.
- 145) He Y, Wang Y, Li P, Zhu S, Wang J, Zhang S. Identification of GPX3 epigenetically silenced by CpG methylation in human esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2011 Mar;56 [3]:681-8. doi: 10.1007/s10620-010-1369-0. Epub 2010 Aug 20. PMID: 20725785.
- 146) Lee OJ, Schneider-Stock R, McChesney PA, Kuester D, Roessner A, Vieth M, Moskaluk CA, El-Rifai W. Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis. *Neoplasia*. 2005 Sep;7 [9]:854-61. doi: 10.1593/neo.05328. PMID: 16229808; PMCID: PMC1501938.
- 147) Priolo C, Khabibullin D, Reznik E, Filippakis H, Ogórek B, Kavanagh TR, Nijmeh J, Herbert ZT, Asara JM, Kwiatkowski DJ, Wu CL, Henske EP. Impairment of gamma-glutamyl transferase 1 activity in the metabolic pathogenesis of chromophobe renal cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul

- 3;115(27):E6274-E6282. doi: 10.1073/pnas.1710849115. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29891694; PMCID: PMC6142242.
- 148) Osawa T, Takeuchi A, Kojima T, Shinohara N, Eto M, Nishiyama H. Overview of current and future systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2019 May 1;49(5):395-403. doi: 10.1093/jjco/hyz013. PMID: 30722031.
- 149) Lázaro M, Valderrama BP, Suárez C, de-Velasco G, Beato C, Chirivella I, González-Del-Alba A, Laínez N, Méndez-Vidal MJ, Arranz JA. SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2019). *Clin Transl Oncol.* 2020 Feb;22(2):256-269. doi: 10.1007/s12094-019-02285-7. Epub 2020 Jan 28. PMID: 31993962.
- 150) Ji JX, Wang YK, Cochrane DR, Huntsman DG. Clear cell carcinomas of the ovary and kidney: clarity through genomics. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):550-564. doi: 10.1002/path.5037. Epub 2018 Feb 23. PMID: 29344971.
- 151) Boss A, Clasen S, Kuczyk M, Schick F, Pereira PL. Image-guided radiofrequency ablation of renal cell carcinoma. *Eur Radiol.* 2007 Mar;17(3):725-33. doi: 10.1007/s00330-006-0415-y. Epub 2006 Oct 5. PMID: 17021704.
- 152) Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark.* 2010;9(1-6):461-73. doi: 10.3233/CBM-2011-0176. PMID: 22112490; PMCID: PMC3308682.
- 153) Scelo G, Larose TL. Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J Clin Oncol.* 2018 Oct 29;36(36):JCO2018791905. doi: 10.1200/JCO.2018.79.1905. Epub ahead of print. PMID: 30372394; PMCID: PMC6299342.
- 154) Testa U, Pelosi E, Castelli G. Genetic Alterations in Renal Cancers: Identification of The Mechanisms Underlying Cancer Initiation and Progression and of Therapeutic Targets. *Medicines (Basel).* 2020 Jul 29;7(8):44. doi: 10.3390/medicines7080044. PMID: 32751108; PMCID: PMC7459851.
- 155) Kim M, Joo JW, Lee SJ, Cho YA, Park CK, Cho NH. Comprehensive Immunoprofiles of Renal Cell Carcinoma Subtypes. *Cancers (Basel).* 2020 Mar 5;12(3):602. doi:10.3390/cancers12030602. PMID: 32150988; PMCID: PMC7139472.
- 156) Tariq N, Mamoon N, Haroon A, Ali Z, Ahmad IN. Role Of Immunohistochemistry In Subtyping Renal Cell Carcinomas With Overlapping Morphological Features. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2018 Jul-Sep;30(3):325-332. PMID: 30465359.
- 157) Tian R, Geng Y, Yang Y, Seim I, Yang G. Oxidative stress drives divergent evolution of the glutathione peroxidase (GPX) gene family in mammals. *Integr Zool.* 2021 Jan 8. doi: 10.1111/1749-4877.12521. Epub ahead of print. PMID: 33417299.

- 158) Kieliszek M. Selenium—Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. *Molecules*. 2019 Apr 3;24(7):1298. doi: 10.3390/molecules24071298. PMID: 30987088; PMCID: PMC6480557.
- 159) Gresner P, Gromadzinska J, Jablonska E, Kaczmarek J, Wasowicz W. Expression of selenoprotein-coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 Jul;65(1):34-40. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.10.023. Epub 2008 Dec 6. PMID: 19058871.
- 160) Chen S, Su X, Mi H, Dai X, Li S, Chen S, Zhang S. Comprehensive analysis of glutathione peroxidase-1 (GPX1) expression and prognostic value in three different types of renal cell carcinoma. *Transl Androl Urol*. 2020 Dec;9(6):2737-2750. doi: 10.21037/tau-20-1398. PMID: 33457246; PMCID: PMC7807338.
- 161) Pronina IV, Klimov EA, Burdenny AM, Beresneva EV, Fridman MV, Ermilova VD, Kazubskaya TP, Karpukhin AV, Braga EA, Loginov VI. [Methylation of the genes for the microRNAs miR-129-2 and miR-9-1, changes in their expression, and activation of their potential target genes in clear cell renal cell carcinoma]. *Mol Biol (Mosk)*. 2017 Jan-Feb;51(1):73-84. Russian. doi: 10.7868/S0026898416060161. PMID: 28251969.
- 162) Zhang Y, Wang J, Liu X. LRRC19-A Bridge between Selenium Adjuvant Therapy and Renal Clear Cell Carcinoma: A Study Based on Data Mining. *Genes (Basel)*. 2020 Apr 17;11(4):440. doi: 10.3390/genes11040440. PMID: 32316597; PMCID: PMC7230350.
- 163) Ekoue DN, Ansong E, Hong LK, Nonn L, Macias V, Deaton R, Rupnow R, Gann PH, Kajdacsy-Balla A, Diamond AM. GPX1 Localizes to the Nucleus in Prostate Epithelium and its Levels are not Associated with Prostate Cancer Recurrence. *Antioxidants (Basel)*. 2018 Nov 18;7(11):167. doi: 10.3390/antiox7110167. PMID: 30453672; PMCID: PMC6262378.
- 164) E. E. Rudenko¹, G. V. Gerashchenko¹, Y. V. Lapska¹, O. O. Bogatyrova¹, S. O. Vozianov², Y. M. Zgonnyk², V. I. Kashuba¹, Genetic and epigenetic changes of GPX1 and GPX3 in human clear-cell renal cell carcinoma
- 165) Tu Y, Li L, Qin B, Wu J, Cheng T, Kang L, Guan H. Long noncoding RNA glutathione peroxidase 3-antisense inhibits lens epithelial cell apoptosis by upregulating glutathione peroxidase 3 expression in age-related cataract. *Mol Vis*. 2019 Nov 14;25:734-744. PMID: 31814699; PMCID: PMC6857780.