

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΤΕΡΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΩΟΘΗΚΩΝ**

ΒΕΝΤΟΥΡΗ ΚΥΡΙΑΚΗ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ



Βυζαντινό κείμενο εν είδει Σταυρού

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα το γιατρό, και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και όλους τους θεούς και όλες τις θεές μάρτυρες βάζω, πως θα τηρήσω τον όρκο μου αυτό, και αυτό το συμβόλαιο, όσο θα διατηρώ τις δυνάμεις μου και την κρίση μου. Το μεν διδάξαντα με την τέχνη αυτή, θα τιμώ όσο και τους δικούς μου γονείς, και θα τον κάνω κοινωνό του δικού μου βίου και θα του οφείλω τα νενομισμένα. Τους δε γιους του, θα θεωρώ ίσους προς αδερφούς μου, και θα τους διδάξω την τέχνη αυτή, αν νοιώθουν την ανάγκη να την μάθουν, χωρίς μισθό και χωρίς έγγραφο συμβόλαιο. Θα διδάξω τα προφορικά και γραπτά μαθήματα και όλη γενικά την υπόλοιπη εξάσκηση του επαγγέλματος, μόνο στους δικούς μου γιους, στους γιους του διδασκάλου μου, και σε μαθητές που με όρκο και συμβόλαιο, κατά τους άγραφους νόμους της ιατρικής, θα έχουν συνδεθεί μαζί μου. Σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιήσω τις θεραπευτικές δίαιτες, μόνο προς όφελος των ασθενών, όσο μπορώ και όπως κρίνω ορθό, να αποφύγω δε κάθε βλάβη και αδικία. Δεν θα χορηγήσω κανένα θανατηφόρο φάρμακο, όποιος κι αν μου το ζητήσει και δεν θα δώσω καμία τέτοια συμβουλή. Επίσης δεν θα δώσω σε καμία γυναίκα φάρμακο για να αποβάλλει. Αγνό και θείο θα διατηρήσω όλο μου το βίο, καθώς και την τέχνη μου. Να μην χειρουργήσω δε κανένα, όπως το ζητούν, αφήνοντας την εργασία αυτή, για άλλους που ασχολούνται με τέτοιες πράξεις. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα εισέρχομαι μόνο προς όφελος των ασθενών, μακριά από κάθε θεληματική αδικία και βλάβη. Και μακριά από γενετήσιες πράξεις, επί γυναικείων σωμάτων και αντρικών, ελευθέρων ή δούλων. Όσα κατά τις θεραπείες ακούσω ή θα δω ή και πέραν της ασχολίας μου στην καθημερινή ζωή των ανθρώπων, για τα οποία δεν πρέπει να λέγεται τίποτε, θα σιωπώ θεωρώντας τα ως εμπιστευτικά μυστικά. Όσο τον όρκο μου λοιπόν θα τηρώ και δεν θα τον παραβαίνω, είτε να έχω καλό όνομα και στη ζωή και στη τέχνη μου και να με εκτιμούν για πάντα όλοι οι άνθρωποι. Εάν δε παραβώ τον όρκο μου και επιορκήσω, να πάθω τα αντίθετα.

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ – ΜΕΛΕΤΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Κα. Πηνελόπη Κορκολοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Καθηγητής – Διευθυντής κ. Ευστράτιος Πατσούρης

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Πηνελόπη Κορκολοπούλου

Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Χαρίκλεια Γακιοπούλου

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Καθηγητής – Διευθυντής κ. Ευστράτιος Πατσούρης

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Πηνελόπη Κορκολοπούλου

Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Χαρίκλεια Γακιοπούλου

Καθηγητής κ. Εμμανουήλ Αγαπητός

Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νικόλαος Καβαντζάς

Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Ανδρέας Λάζαρης

Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Αφροδίτη Νόννη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα πρωταρχικά να ευχαριστήσω εκ βάθους ψυχής την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέπουσα καθηγήτρια της επιστημονικής μελέτης κα. Πηνελόπη Κορκοπούλου για την αποδοχή, την στήριξη, την καθοδήγηση, την συμβολή, την κατανόηση, τη μεγαλοψυχία και την αμέριστη βοήθειά της στη διάρκεια αυτής της επιστημονικής διαδρομής.

Βαθύτατη ευγνωμοσύνη οφείλω και θερμά ευχαριστώ τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, τον καθηγητή μας, Κ. Ευστράτιο Πατσούρη για την απεριόριστη συμπαράστασή του και τις εύστοχες και πολύτιμες υποδείξεις του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Χαρά Γακιοπούλου για την ευγένεια, την οργάνωση, την στήριξη, την καθοδήγηση και την συμβολή της στο εκπόνημα αυτό.

Ευχαριστώ βαθιά την άοκνη συνεργάτιδα του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής και εξαιρετη συνάδελφο δρ. Γεωργία Λεβίδου για την συνολική εγκάρδια συμπαράσταση και καθοριστική συμβολή της σε αυτή την διατριβή.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω επίσης στο σύνολο των συναδέλφων και συνεργατών του Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για την σημαντικότερη συνδρομή τους στην εργασία αυτή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την στενή και ευρύτερη οικογένειά μου, και κυρίως τον σύζυγο και τα παιδιά μου, για την στήριξη που μου παρείχαν στις δύσκολες στιγμές.

Στον πατέρα μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό σημείωμα	10
Εισαγωγή	22

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

1. Εισαγωγή στον κυτταρικό κύκλο.....	26
2. Ρύθμιση του κύκλου στα ευκαρυωτικά κύτταρα.....	31
2Α. Ο ρόλος των κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.	31
2Α1.Γενικός μηχανισμός της αλληλεπίδρασης κυκλίνης- CDK.....	34
2Α2. Ειδική δράση των συμπλεγμάτων cyclin-CDK	35
2Β.Αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.....	36
2Β1. Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.....	37
3. Αντιγραφή DNA – μοντέλο αδειοδότησης.....	39
3Α. Πρωτεΐνες αδειοδότησης αντιγραφής του DNA- MCM.....	41
3Α1.Δομή και λειτουργία των MCM2-7	41
3Α2. Ο μηχανισμός αδειοδότησης αντιγραφής του DNA και η στρατολόγηση των MCM2-7.....	46
3Α3. Η ρύθμιση του συστήματος αδειοδότησης αντιγραφής του DNA	48
i) Η ρύθμιση της αδειοδότησης αντιγραφής του DNA στο σακχαρομύκητα.....	48
ii) Η ρύθμιση της αδειοδότησης αντιγραφής του DNA στα μετάζωα.....	50
3Α4. Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου	54
3Α5. Συντονισμός της αδειοδότησης αντιγραφής του DNA και του αναπαραγωγικού δυναμικού.	55
4. Πρωτεΐνη αντιγραφής RPA.....	60
4Α. Δομή RPA και σύνδεση με το DNA.....	60

4B. Συμμετοχή της πρωτεΐνης RPA στον έλεγχο των βλαβών του DNA	64
4Γ. Συμμετοχή της πρωτεΐνης RPA στην επιδιόρθωση του DNA	65
4Δ. φωσφορυλίωση και υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης RPA.....	66
B. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΩΟΘΗΚΩΝ	
1. Εισαγωγή.....	70
2. Επιδημιολογία – Αιτιολογία	73
3. Όγκοι του επιφανειακού επιθηλίου – στρώματος των ωοθηκών (κοινοί επιθηλιακοί όγκοι)	74
3A. Ορώδη νεοπλάσματα	76
3A1. Ορώδες κυσταδένωμα	76
3A2. Οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα	77
3A3. Ορώδη καρκινώματα.....	81
3B. Βλεννώδη καρκινώματα.....	82
3B1. Βλεννώδες κυσταδένωμα	83
3B2. Οριακής κακοηθείας βλεννώδες νεόπλασμα και βλεννώδες καρκίνωμα.....	83
i) εντερικού τύπου οριακής κακοηθείας βλεννώδη νεοπλάσματα	83
ii) ενδοτραχηλικού τύπου οριακής κακοηθείας βλεννώδη νεοπλάσματα	87
3Γ. Ενδομητριοειδείς όγκοι	88
3Δ. Διαυγοκυτταρικοί όγκοι	90
3E. Νεοπλάσματα με μεταβατικού τύπου επιθήλιο.....	91
3E1.Καλοήγη (όγκος Brenner)	91
3E2. Οριακής κακοηθείας όγκος Brenner	91
3E3. Κακοήθης όγκος Brenner	92
3E4. Καρκίνωμα εκ μεταβατικού επιθηλίου	92
3ΣΤ.Νεοπλάσματα εκ πλακώδους επιθηλίου	92
3ΣΤ1. Επιδερμοειδής κύστη	92
3ΣΤ2. Καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου	92

3Z. Μικτά επιθηλιακά νεοπλάσματα	93
3H. Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα.....	93
4. Σταδιοποίηση καρκίνου ωοθηκών	93
5. Μηχανισμοί καρκινογένεσης - παράγοντες κινδύνου	94
6. Μορφολογική και μοριακή ανομοιογένεια των επιθηλιακών όγκων ωοθήκης	98
7. Θεωρίες προέλευσης των επιθηλιακών όγκων της ωοθήκης	99
8. Εφαρμογές για έρευνα, screening, πρόληψη και θεραπεία	108

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΣΚΟΠΟΣ	114
------------------------	-----

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Γενικά στοιχεία ασθενών	115
Επεξεργασία υλικών και ανοσοϊστοχημεία	117
Στατιστική ανάλυση.....	119

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

–Έκφραση των MCM-2 και MCM-5 σε οριακής κακοήθειας όγκους και αδеноκαρκινώματα ωοθήκης	122
–Έκφραση των MCM-2 και MCM-5 στα αδеноκαρκινώματα ωοθήκης σε σχέση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους	123
–Έκφραση της RPA2 και συσχέτιση της με κλινικοπαθολογο- ανατομικές παραμέτρους	126
–Σχέση της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 με το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	129
–Έκφραση των MCM-2, MCM-5 και Ki-67 σε καλλιέργεια κυττάρων MDAH-2774	130
–Συσχέτιση της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 με P27 ^{Kip1} , P21 ^{WAF1} , p53 και pRB	131

Συσχετίσεις της έκφρασης της RPA2 με την έκφραση των MCM-2, MCM-5 και Ki67.....	132
- Μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης	133
- Μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης στην ομάδα ελέγχου	133
- Ανάλυση επιβίωσης.....	135
 Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	138
 Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	148
 ΣΤ. SUMMARY	150
 Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	152

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Βεντουρή Κυριακή Αλεξάνδρου

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Φιλικών 14, ΤΚ: 29100, Ζάκυνθος

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 26950-49400, 6976-607694

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: Ζάκυνθος

ΟΙΚΟΓ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Έγγαμη με δύο παιδιά

A. ΣΠΟΥΔΕΣ - ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

30 Ιουλίου 1991 Πτυχιούχος Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Βαθμός πτυχίου: ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ

09 Αυγούστου 1991 Χορήγηση αδείας ασκήσεως ιατρικού
επαγγέλματος

30/08/1991 - 06/01/1993 Έμμισθη ειδικευομένη στο Παθολογοανατομικό

15/01/1993 - 22/03/1994 Εργαστήριο του Αρεταιείου Νοσοκομείου

15/04/1994 - 16/10/1995 Έμμισθη ειδικευομένη στο Παθολογο-
ανατομικό Εργαστήριο του Γενικού
Κρατικού Νοσοκομείου Αθηνών

24/11/1995 - 17/12/1996 Έμμισθη ειδικευομένη στο Κυτταρο-
λογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου
Άγιος Σάββας

17 Μαρτίου 1997 Χορήγηση τίτλου ειδικότητας Παθολο-
γικής Ανατομικής

10/04/1997- 15/09/1998 Εκπλήρωση υποχρεωτικής υπηρεσίας
υπαίθρου / ΠΙ Μαχαιράδου – Κ.Υ. Κα-
τασταρίου νομού Ζακύνθου

17 Σεπτεμβρίου 1998 Έναρξη ελεύθερου επαγγέλματος.

10 Νοεμβρίου 2003 Χορήγηση άδειας Λειτουργίας Ιδιωτικού
Φορέα Παροχής Υπηρεσιών Π.Φ.Υ

B ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

B1. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Αγγειομύξωμα ελάσσονος πυέλου

Β. Σμυρنيώτης, Α. Κόνδη – Παφίτη, **Κ. Βεντουρή**, Α. Βεργέτης, Ε. Κουριάς

Β΄ Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών

Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Αρεταιείου Νοσοκομείου

Περιοδικό Ιατρική 63, 1993

2. Early development and learning difficulties

P. Diakakis, **K. Ventouri**, E.-E. Visvardis, A. Belsi, N. Kosmadakis, P.
Kapsabelis, S. Tsitoura

Department of Pediatrics, General Hospital of Zakynthos

Social Welfare Services, Mayorship of Zakynthos, Department of Social
Pediatrics, Child Hospital Aglaia Kyriakou, Athens Greece

3. Minichromosome maintenance (MCM) proteins 2 and 5 in non benign epithelial ovarian tumors: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications.

Hariklia Gakiopoulou, Penelope Korkolopoulou, Georgia Levidou, Irene Thymara, Angelica Saetta, Christina Piperi, Nikolaos Givalos, Ioannis Vasilopoulos, **Kyriaki Ventouri**, Artemis Tsenga, Aristotelis Bamias, Meletios – Athanasios Dimopoulos, Emmanuel Agapitos, Efstathios Patsouris.

Department of pathology, Athens University, School of Medicine

Department of Biological Chemistry , Athens University, School of Medicine

Department of Therapeutics, Alexandra General Hospital, Athens University, School of Medicine

British Journal of Cancer, 2007 97 (8): 1124-34

4. Replication Protein A in Nonearly Ovarian Adenocarcinomas: Correlation With MCM-2, MCM-5, Ki-67 Index and Prognostic Significance

Georgia Levidou, M.D., M.Sc., Ph.D., Kiriaki Ventouri, M.D., Afroditi Nonni, M.D., Ph.D., Hariklia Gakiopoulou, M.D., Ph.D., Aristotle Bamias, M.D., Ph.D., Maria Sotiropoulou, M.D., Irene Papaspirou, M.D., Meletios A. Dimopoulos, M.D., Ph.D., Efstratios Patsouris, M.D., Ph.D., and Penelope Korkolopoulou, M.D., Ph.D.

First Department of Pathology, Medical School, Laiko Hospital (G.L., K.V., A.N., H.G., E.P., P.K.); Department of Clinical Therapeutics, Alexandra General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens (A.B., M.A.D.); and Department of Pathology, Alexandra General Hospital, (M.S., I.P.) Athens, Greece.

G.L. and K.V. have contributed equally.

International Journal of Gynecological Pathology, 2012 31:319–327.

B2. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

- Συμμετοχή **ως ομιλήτρια** σε επιστημονική εκδήλωση με θέμα << Ήλιος και Δέρμα >> που διοργάνωσε το Παράρτημα Ζακύνθου της Ε.Α.Ε. σε συνεργασία με τον Ιατρικό Σύλλογο, 15 Ιουνίου 2001
- Συμμετοχή **ως ομιλήτρια** σε επιστημονική εκδήλωση με θέμα <<Διάγνωση και θεραπεία παθολογίας μαστού και τραχήλου μήτρας >> που διοργάνωσε το Παράρτημα Ζακύνθου της Ε.Α.Ε., 03 Ιουνίου 2006
- Συμμετοχή **ως ομιλήτρια** σε ενημερωτικές ομιλίες με θέμα « σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και εμβόλιο κατά του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας» στο 1^ο Γυμνάσιο Νομού Ζακύνθου , Μάρτιος 2011
- Συμμετοχή **στην οργανωτική επιτροπή** της επιστημονικής εκδήλωσης που διοργάνωσε ο Ιατρικός Σύλλογος Ζακύνθου με θέμα

<< Μαθησιακές δυσκολίες και προβλήματα συμπεριφοράς στα παιδιά των δημοτικών σχολείων της Ζακύνθου >>, 14 Μαΐου 2005

- Συμμετοχή **στην οργανωτική επιτροπή** της επιστημονικής εκδήλωσης / διημερίδας που διοργάνωσε ο Ιατρικός Σύλλογος Ζακύνθου με θέμα << Επείγουσα Ιατρική >>, 11 και 12 Ιουνίου 2005

B3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. RETROPERITONIAL TUMORS. HOW EFFECTIVE IS SURGICAL TREATMENT

D, Voros, A. Prachalias, C. Yiallouras, K. Ventouri, I. Papadimitriou
International and 3rd Panhellenic Congress on Radiation Oncology, 23-09-1993

2. SCHEDULED AFTER SCHOOL ACTIVITIES OF NATIVE PUPILS OF ELEMENTARY SCHOOL AND CHILDREN OF FINANCIAL IMMIGRANTS OF THE SAME AGE IN THE ISLAND OF ZAKYNTHOS. COMPARISON STUDY.

Tsitoura S., Nikolaou A., Ventouri K., Sideri A., Baltatzidou K., Diakakis P.
XVII Symposium of Social Pediatrics, Sibenik – Croatia, June 22-25, 2005

3. LEARNING DIFFICULTIES IN NATIVE STUDENTS AND IMMIGRANTS IN THE ISLAND OF ZAKYNTHOS – GREECE

P. Diakakis, K. Nikolaou, S. Tsitoura, K. Ventouri, G. Kefalonitis, I. Gardelis, S. Drapanioti

XVII Symposium of Social Pediatrics, Sibenik – Croatia, June 22-25, 2005

4. EXPERIMENTAL BURNS: POSSIBILITY OF TREATMENT WITH NO DONORS COMBINED WITH EMBLICA EXTRACT

Vitsos A., A. Gougoustamou, K. Ventouri, D. Giorkas, A. Lima, G. Papaioannou, M. Rallis, G. Delicantinos, B. Starcher.

3RD International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology.

B4. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΟΣΙΑ

1. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΧΑΜΗΛΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ (ΟΡΙΑΚΗΣ) ΒΛΕΝΝΩΔΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

A. Κόνδη – Παφίτη, E. Καϊρή – Βασιλάτου, K. Βεντουρή, E. Σπανίδου – Καρβούνη, Σ. Παπαπέτρου, E. Δεληγεώργη – Πολίτη

7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Πειραιάς 4 – 7 Νοεμβρίου 1993

2. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 4 ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΚΥΣΤΑΔΕΝΩΜΑΤΩΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

A. Κόνδη – Παφίτη, E. Σπανίδου – Καρβούνη, K. Βεντουρή, E. Καϊρή – Βασιλάτου, Σ. Παπαπέτρου, E. Δεληγεώργη – Πολίτη.

7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Πειραιάς 4 – 7 Νοεμβρίου 1993

3. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΕΩΣ ΤΗΣ ΑΔΕΝΟΜΥΩΣΕΩΣ ΜΕ ΤΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Ε. Καϊρη – Βασιλάτου, Α. Κόνδη – Παφίτη, Σ. Παπαπέτρου, Κ. Βεντουρή, Π. Γρυλά-κης, Ε. Δεληγεώργη – Πολίτη.

7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Πειραιάς 4 – 7 Νοεμβρίου 1993

4. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΟΠΙΣΘΟΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Δ. Βώρος, Α. Πραχαλιάς, Χ. Γιάλλουρος, Κ. Βεντουρή, Ι. Παπαδημητρίου
XIX Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Θεσσαλονίκη 30 Οκτωβρίου 1994

5. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΑΠΟ ΤΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΥ

Α. Πραχαλιάς, Γ. Πολυμενέας, Ι. Βασιλείου, Κ. Βεντουρή, Ι. Παπαδημητρίου
XIX Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Θεσσαλονίκη 30 Οκτωβρίου 1994

6. ΝΗΣΙΔΙΩΜΑΤΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ, ΠΑΘΟΛΟΓΟ-ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Β. Σμυρνιώτης, Ν. Αρκαδόπουλος, Κ. Βεντουρή, Θ. Θεοδοσόπουλος, Ι. Παπαδημητρίου

XIX Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Θεσσαλονίκη 30 Οκτωβρίου 1994

7. ΛΕΙΟΜΥΩΜΑΤΑ ΓΛΩΣΣΑΣ. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Χριστίνα Παπαντώνη, Κλειώ Παπαπαρασκευά, **Κυριακή Βεντουρή**, Σ. Βαλσάμης, Α. Γιαννουλόπουλος, Κων/να Φραγκιά

15^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων, Θεσσαλονίκη 10 – 13 Νοεμβρίου 1994

8. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ ΣΕ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ

Χ. Παπαντώνη, Π. Γιάννου, Σ. Σκαφιδά, Κ. Διαμαντοπούλου, **Κ. Βεντουρή**, Κ. Φραγκιά

Συμπόσιο Ελληνικής Εταιρείας Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής

< Νεοπλασματικές Παθήσεις Οισοφάγου – Στομάχου >, Ιωάννινα 27 Μαΐου 1995

9. ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΑΙΔΟΙΟΥ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Παπαντώνη Χριστίνα, Σκαφιδά Σοφία, **Βεντουρή Κυριακή**, Παπαλιώδη Ευγενία

2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, Δελφοί 6- 8 Οκτωβρίου 1995

10. ΙΝΟΘΗΚΩΜΑ ΩΟΘΗΚΗΣ – ΑΝΑΦΟΡΑ ΜΙΑΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ

Π. Καψαμπέλης, Ε. Πάλλη, **Κ. Βεντουρή**, Γ. Κονίδης, Χ. Μαρίνου, Γ. Θεοδωρόπουλος, Σ. Στρούζας, Λ. Κακλαμάνης.

5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γεροντολογίας – Γηριατρικής, Αθήνα 11-13 Δεκεμβρίου 1997

11. ΧΑΜΗΛΗ ΠΡΟΣΘΙΑ ΕΚΤΟΜΗ ΟΡΘΟΥ - ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΗ ΜΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΣΥΡΡΑΠΤΙΚΟ

Π. Καψαμπέλης, Ε. Πάλλη, Κ. Τσαγκαρόπουλος, Σ. Μυλωνάς, Μ. Σταυρίδης, Δ. Στήθος, Χ. Αβραμίδου, **Κ. Βεντουρή**,

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθήσεων Παχέος Εντέρου – Πρωκτού, Αθήνα 20-22/09/02

12. ΚΑΤΑΔΥΟΜΕΝΗ ΒΡΟΓΧΟΚΗΛΗ. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΡΙΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ

Π. Καψαμπέλης, Γ. Παναγόπουλος, Δ. Λαγοδήμος, Α. Κάρδαρη, Κ. Ζαρκάδης, **Κ. Βεντουρή**, Ε. Πάλλη, Δ. Κοντοσταυλάκη.

12^ο Ετήσιο Συνέδριο Ιατροχειρουργικής Εταιρείας Κέρκυρας, 11-13 Απριλίου Κέρκυρα 2004

13. ΑΘΛΗΣΗ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΣΧΟΛΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΣΤΗΝ ΖΑΚΥΝΘΟ

Π. Διακάκης, Ι. Γαρδέλης, **Κ. Βεντουρή**, Σ. Δραπανιώτη, Κ. Παλτατζίδου, Σ. Κώτσιας, Π. Καψαμπέλης.

10^ο Υγειονομικό Συμπόσιο < Άθληση - Doping >, Κεφαλονιά 2 – 4 Σεπτεμβρίου 2005

14. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΟΠΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΙΜΙΚΟΥΙΜΟΔΗΣ 5% . ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΕΝΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ.

Μ. Ζιώγα, Κ. Παλτατζίδου, Ι. Θεοδόσης, Κ. Μίρκου, **Κ. Βεντουρή**.

Φθινοπωρινή Ημερίδα Ελληνικής Δερματολογικής Εταιρείας, 24 Σεπτεμβρίου 2005

B5. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΟΣΙΑ

1. ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΣ ΑΓΓΕΙΟΜΥΞΩ-ΜΑΤΟΣ ΕΛΑΣΣΟΝΟΣ ΠΥΕΛΟΥ

Α. Κόνδη – Παφίτη, Κ. Βεντουρή, Α. Γιαννακοπούλου, Ε. Καΐρη

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, 16-18 Οκτωβρίου 1992

2. ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟ-ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΡΙΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΟΣ ΘΗΛΕΟΣ

Ε. Καΐρη – Βασιλάτου, Α. Κόνδη – Παφίτη, Α. Γιαννακοπούλου, Κ. Βεντουρή

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, 16 -18 Οκτωβρίου 1992

3. ΑΝΟΣΟ-ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV ΣΕ ΑΚΡΟΧΟΡΔΟΝΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΑΙΔΟΙΟΥ

Α. Κόνδη – Παφίτη, Α. Γιαννακοπούλου, Ε. Καΐρη, Κ. Βεντουρή

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, 16 -18 Οκτωβρίου 1992

4. ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 33 ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Α. Κόνδη – Παφίτη, Ε. Καΐρη, Α. Λιάπης, Κ. Βεντουρή, Α. Γιαννακοπούλου.

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, 16-18 Οκτωβρίου 1992

5. ΓΑΓΓΛΙΟΝΕΥΡΩΜΑ ΟΠΙΣΘΟΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟΥ ΧΩΡΟΥ

Βεντουρή Κ., Διαμαντοπούλου Κ., Σαμπαζιώτης Δ., Ζώης Ε., Φραγκιά Κ.

5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιωάννινα 23-26 Μαΐου 1996

- 6. ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ . ΕΝΔΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΑΙΡΕΣΗ**
 Π. Καψαμπέλης, **Κ. Βεντουρή**, Ε. Πάλλη, Α. Κοϊνης, Μ. Τσουκαλάς, Α. Λυκούδη, Ι. Θεοδόσης, Γ. Κονίδης.
 9^ο Πανκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο – Κρήτη, 5 – 8 Νοεμβρίου 1998
- 7. COLORECTAL CANCER – LOCATION & STAGING**
 Ρ. Kapsambelis, Ε. Palli, Κ. Tsagaropoulos, Α. Stergiou, Ch. Auramidou, Μ. Kandila, **Κ. Ventouri**, Κ. Kardari
 8th Biennial Congress European Council of Coloproctology, Prague April 29, 2001
- 8. ΕΓΚΟΛΕΑΣΜΟΣ ΠΑΙΔΙΟΥ 7 ΕΤΩΝ**
 Π. Διακάκης, Ν. Σπίνος, **Κ. Βεντουρή**, Δ. Παναγούλιας, Α. Μάρκου, Γ.Π. Κονίδης
 4^ο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδος, Ζάκυνθος 1 – 3 Ιουνίου 2001
- 9. ΟΖΩΔΗΣ ΣΚΛΥΡΗΝΣΗ**
 Π. Διακάκης, Ν. Σπίνος, **Κ. Βεντουρή**, Ε. Μιχαηλίδου, Γ. Βόγκ, Μ. Βακάκη
 4^ο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδος, Ζάκυνθος 1 – 3 Ιουνίου 2001
- 10. ΥΠΕΡΣΚΗΝΙΔΙΟΣ ΟΓΚΟΣ PNET**
 Π. Διακάκης, **Κ. Βεντουρή**, Ε. Μιχαηλίδου, Ν. Διαμαντόπουλος, Φ. Προδρόμου, Κ. Στεφανάκη
 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2001, Κρήτη 1 – 3 Ιουνίου 2001
- 11. ΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΗ ΧΟΛΟΚΥΣΤΟΠΑΘΕΙΑ**
Κ. Βεντουρή, Ε. Πάλλη, Π. Διακάκης, Ε. Μιχαηλίδου, Χ. Αβραμίδου, Κ. Τσαγκαρό-πουλος, Ι. Πανόπουλος, Π. Καψαμπέλης.
 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστροεντερολογίας, Ιωάννινα 27/09 – 01/10 2001
- 12. ΕΠΙΘΗΛΙΩΜΑ ΤΟΥ MALHERBE (PILOMATRIXOMA)**
Κ. Βεντουρή, Π. Διακάκης, Ε. Μιχαηλίδου, Ι. Χοροζίδης, Β. Μουσάτου, Μ. Μηλίγκου, Ι. Θεοδόσης
 40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 21 – 23 Ιουνίου 2002
- 13. HALO NEVUS (ΔΕ) ΟΦΡΥΟΣ**
 Ι. Θεοδόσης, **Κ. Βεντουρή**, Α. Μάρκου, Ε. Μιχαηλίδου, Ε. Πάλλη, Γ. Παναγόπουλος, Π. Διακάκης,
 5^ο Παμπελοποννησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Πάτρα 18 – 20 Οκτωβρίου 2002
- 14. ΜΟΝΗΡΕΣ ΑΓΓΕΙΟΚΕΡΑΤΩΜΑ**
 Π. Διακάκης, **Κ. Βεντουρή**, Ε. Μιχαηλίδου, Ε. Πάλλη, Α. Προβής, Χ. Τσαγκαρουσιάνος, Ι. Θεοδόσης
 41^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος 13 – 15 Ιουνίου 2003
- 15. ΤΗΛΕΘΕΑΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΜΑΘΗΤΩΝ ΔΗΜΟΤΙΚΟΥ ΣΧΟΛΕΙΟΥ ΣΤΗΝ ΖΑΚΥΝΘΟ**
 Π. Διακάκης, **Κ. Βεντουρή**, Γ. Σιδηροκαστρίτης, Χρ. Αραποστάθη, Κ. Λιβέρης, Σ. Τσίτουρα
 42^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη 28 – 30 Μαΐου 2004

16. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΕΣ ΕΞΩΣΧΟΛΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΜΑΘΗΤΩΝ ΔΗΜΟΤΙΚΟΥ ΣΧΟΛΕΙΟΥ ΣΤΗΝ ΖΑΚΥΝΘΟ. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ ΜΕΤΑΝΑΣΤΩΝ

Π. Διακάκης, **Κ. Βεντουρή**, Ι. Γαρδέλης, Θ. Λάππα, Αικ. Νεστορίδου, Σ. Τσίτουρα

42^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη 28 – 30 Μαΐου 2004

17. ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΝΟΜΟΥ ΖΑΚΥΝΘΟΥ

Ι. Γαρδέλης, Α. Μάρκου, Σ. Κώτσιας, Α. Κατσούλη, **Κ. Βεντουρή**, Π. Διακάκης

6^ο Παμπελοποννησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Πύργος Ηλείας 15 – 17 Οκτωβρίου 2004

18. ΗΛΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Π. Διακάκης, Ι. Γαρδέλης, Α. Χατζηαντωνίου, Α. Κλωντζάκη, Α. Χρονοπούλου, **Κ. Βεντουρή**, Ι. Θεοδόσης

6^ο Παμπελοποννησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Πύργος Ηλείας 15 – 17 Οκτωβρίου 2004

19. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΣΙΑΚΕΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ

Π. Διακάκης, Γ. Κεφαλωνίτης, Κ. Σακελαρόπουλος, **Κ. Βεντουρή**, Α. Νικολάου, Α. Νεστορίδου, Α. Πατρινού, Σ. Τσίτουρα

4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδοψυχιατρικής, Αθήνα 27- 29 Μαΐου 2005

20. CHILDREN'S LEARNING DIFFICULTIES AND THE EDUCATIONAL LEVEL OF PARENTS

P. Diakakis, G. Christopoulos, **K. Ventouri**, S. Leontiadi, S. Voultsou, A. Nikolaou, S. Tsitoura

ESSOP Annual Scientific Meeting 2006, Cardiff / Wales, July 12 – 16 2006

21. ΜΑΘΗΣΙΑΚΕΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΝΕΟΓΝΩΝ

Π. Διακάκης, Γ. Χριστόπουλος, **Κ. Βεντουρή**, Δ. Ξανθόπουλος, Α. Νικολάου, Σ. Τσίτουρα.

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεογνολογίας, 7-9 Απριλίου 2006

22. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ ΣΤΟ ΝΟΜΟ ΖΑΚΥΝΘΟΥ

Ι. Γρυπάρης, **Κ. Βεντουρή**, Ι. Γαρδέλης, Σ. Λεοντιάδη, Γ. Παχούμης, Ε. Σιαμούτα, Π. Διακάκης

7^ο Παμπελοποννησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Πάτρα 20 – 22 Οκτωβρίου 2006

B6 ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποψηφία Διδάκτωρ ΕΚΠΑ, Ιατρική Σχολή, από 06-10-2006 έως σήμερα με θέμα: << Μελέτη νεώτερων δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε Καρκινώματα Ωοθηκών >>

B7 ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Τακτικό μέλος της Ελληνικής Εταιρίας Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής.

- Τακτικό μέλος με χρέη γραμματέως του Παραρτήματος Ζακύνθου της Ελληνικής Αντικαρκινικής Εταιρείας από το έτος 2001 με συντονισμό της διενέργειας του Αντικαρκινικού Εράνου.
- Εκπρόσωπος του Ιατρικού Συλλόγου Ζακύνθου στον Πανελλήνιο Ιατρικό Σύλλογο για δύο τριετίες, κατόπιν αρχαιρεσιών.

B8 ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Πιστοποιημένη γνώση της Αγγλικής Γλώσσας
- Πιστοποιημένη γνώση διαχείρισης Ηλεκτρονικών Υπολογιστών

Γ. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Γ1. ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΟΜΕΝΗ

Γ1.1. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΙΣ

1. Πληροφορική και οργάνωση εργασίας (40 ώρες /1997)
2. Εισαγωγή στη χρήση Η / Υ (100 ώρες / 2004)
3. Επιμόρφωση εργοδοτών για άσκηση καθηκόντων τεχνικού ασφαλείας (10 ώρες / 2005)
4. Εκπαίδευση ενηλίκων στην απόκτηση βασικών δεξιοτήτων στις νέες τεχνολογίες (50 ώρες / 2006)

Γ1.2. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑ, ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΟΡΓΑΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

1. Παρακολούθηση μαθημάτων Ηλεκτροκαρδιογραφήματος
Γενικό Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών / Διεύθυνση Εκπαίδευσης 1984-1985
2. 18^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
Αθήνα 12 – 16 Μαΐου 1992
3. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας
Δελφοί 16 – 18 Οκτωβρίου 1992
4. Μετεκπαιδευτικό Μάθημα με θέμα : Εφαρμογές Μοριακής βιολογίας στην Παθολογική Ανατομική, Αθήνα 20 Ιανουαρίου 1993
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
5. 2^ο Πολυθεματικό Ιατρικό Συμπόσιο
251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας, Αθήνα 5^η και 6^η Φεβρουαρίου 1993
6. Μετεκπαιδευτικό Μάθημα με θέμα Εφαρμογές Μοριακής βιολογίας στην Παθολογική Ανατομική, Αθήνα 10 Φεβρουαρίου 1993
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
7. Ημερίδα με θέμα: Διαγνωστική Συμβολή των Αντισωμάτων στην Ογκολογία , Αθήνα 12 Ιουνίου 1993
8. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα: Νεφρική Μεταμόσχευση
Αθήνα 13-11-1993, International Academy of Pathology / Hellenic Division

9. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα: Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις Χειρουργικής Παθολογίας
Αθήνα, International Academy of Pathology / Hellenic Division
10. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα: Διάγνωση παθήσεων θυρεοειδούς αδένος με χρήση λεπτής βελόνης
Αθήνα, International Academy of Pathology / Hellenic Division
11. Επιστημονική Ημερίδα με θέμα: Ροχαλητό – Υπνική Άπνοια
Αθήνα 29 Ιανουαρίου 1994, Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών
12. Ιατρικό Συμπόσιο με θέμα : Σκλήρυνση κατά Πλάκας
Αθήνα 9 Απριλίου 1994, Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών
13. Ημερήσιο Ιατρικό Συμπόσιο με θέμα: Προκαρκινικές Αλλοιώσεις και Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας, αναλυτική προσέγγιση.
Αθήνα 16 Απριλίου 1994, Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών
14. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας
Αθήνα 23 – 26 Νοεμβρίου 1994
15. Σεμινάριο με θέμα: Κυτταρομετρία Ροής – Κλινικές Εφαρμογές
Αθήνα 21 Ιανουαρίου 1995
16. Μετεκπαιδευτικό Μάθημα με θέμα: Κακοήγη Νεοπλασμάτα Μαλακών Μορίων, Αθήνα 27 Ιανουαρίου 1995
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
17. Μετεκπαιδευτικό Μάθημα με θέμα: Κλινικοπαθολογοανατομική προσέγγιση του Ουρολογικού Καρκίνου, Αθήνα Μαΐου 1995
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
18. 1^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Παθολογίας Τραχήλου και Κολποσκόπησης, Αθήνα 01 – 03 Ιουνίου 1995
19. Μετεκπαιδευτικό Μάθημα με θέμα: Κλινικοπαθολογοανατομική προσέγγιση Όγκων ΚΝΣ, Αθήνα 26 Ιανουαρίου 1996
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
20. Μετεκπαιδευτικό Μάθημα με θέμα: Ιστοπαθολογία Ενδοκρινών Αδένων, (Πλήν Θυρεοειδούς) Αθήνα 09 Φεβρουαρίου 1996
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
21. Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα: Αγγειϊτίδες, Αθήνα 01 Μαρτίου 1996
Διεθνής Ακαδημία Παθολογικής Ανατομικής, Ελληνικό Τμήμα
22. Μετεκπαιδευτικό Μάθημα με θέμα: Ιογενείς Ηπατίτιδες
Αθήνα 16 Μαρτίου 1996
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
23. OECI Pathology Group Meeting
Athens May 10 – 12, 1996
24. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής
Ιωάννινα, 23 – 26 Μαΐου 1996
25. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας
Αθήνα 12 – 15 Νοεμβρίου 1997
26. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γeronτολογίας - Γηριατρικής
Αθήνα 11- 13 Δεκεμβρίου 1997
27. 31^η Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση
Αθήνα 25 –26 Απριλίου 1998

28. 1st Joint International Symposium Advances in Medicine & Surgery
Zakynthos July 22 – 27, 1998
29. 11^ο Ετήσιο Σεμινάριο Παιδιατρικής Αιματολογίας / Ογκολογίας
Αθήνα 17 Οκτωβρίου 1998
30. 9^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο
Ηράκλειο, 8 Νοεμβρίου 1998
31. 3^ο Πανελλήνιο Παιδοορθοπεδικό Συνέδριο
Αθήνα 20 – 21 Νοεμβρίου 1998
32. Αλλεργιολογική Ημερίδα με θέμα: Ατοπική δερματίτιδα και άσθμα
Αθήνα, 21 Νοεμβρίου 1998
33. Επιστημονική ημερίδα με θέμα: Ορχική βιοψία σε προβλήματα γονι-
μότητας και καρκίνος προστάτη αδένος Αθήνα 22 Ιανουαρίου 1999
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
34. Διήμερο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα: Νεοπλάσματα Γαστρε-
ντερικού συστήματος. Αθήνα 05 Φεβρουαρίου 1999
Ελληνική Εταιρεία Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής
35. 9^η Επιστημονική Δημερίδα Παιδιατρικών Αναπνευστικών Παθήσεων
Αθήνα 04 Ιουνίου 2000
36. 4^ο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδος
Ζάκυνθος, 01 – 03 Ιουνίου 2001
37. European Society of Paediatrics Congress
Spetses Island, Greece September 25 – 28, 2002
38. 13^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής
Πάτρα, 18 και 19 Ιανουαρίου 2003
39. Επιστημονική Εκδήλωση με θέμα: Ασθενής με Νεφρική Νόσο / Νεφρική
Ανεπάρκεια. Ζάκυνθος, 25 Σεπτεμβρίου 2004
40. 24^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής
Αθήνα, 06 και 07 Νοεμβρίου 2004
41. 6^η Εκπαιδευτική Δημερίδα με θέμα: Πρακτικά Παιδιατρικά Θέματα
Πάτρα, 23 και 24 Απριλίου 2005
42. Δημερίδα Επείγουσας Ιατρικής
Ζάκυνθος, 11 και 12 Ιουνίου 2005
43. Annual Meeting of the European Society for Social Paediatrics
Sibenice, Croatia June 22 – 25, 2005
44. 10^ο Υγειονομικό Συμπόσιο
Ληξούρι Κεφαλληνίας, 02 – 04 Σεπτεμβρίου 2005
45. Ιατροφιλοσοφική Συνάντηση με θέμα: Ευθανασία
Ζάκυνθος, 01 Οκτωβρίου 2005
46. 18^ο Μετεκπαιδευτικό Παιδιατρικό Διήμερο
Αθήνα, 10 και 11 Δεκεμβρίου 2005
47. 7^η Εκπαιδευτική Ημερίδα με θέμα: Πρακτικά Παιδιατρικά Θέματα
Πάτρα, 15 και 16 Απριλίου 2006
48. 10^ο Πανελλήνιο Παθολογοανατομικό Συνέδριο
Ιωάννινα, 23 και 24 Μαΐου 2006
49. 4^η Επιστημονική Συνάντηση του Ελληνικού Κολλεγίου Παιδιάτρων
Σύρος, 30 Ιουνίου έως 02 Ιουλίου 2006

50. Meeting of the European Society of Social Paediatrics
Cardiff, Wales, July 14, 2005
51. Επιστημονική Συνάντηση της Ελληνικής Ακαδημίας Παιδιατρικής
Σκαφιδιά Ηλείας, 22 και 23 Σεπτεμβρίου 2006
52. 7^ο Παμπελοποννησιακό Ιατρικό Συνέδριο
Πάτρα, 20 – 22 Οκτωβρίου 2006
53. 17^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής
Πάτρα 20 και 21 Ιανουαρίου 2007
54. ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ ΔΕΡΜΑΤΟΣ
Αθήνα 30 Μαρτίου 2007
55. ΜΕΛΑΝΩΜΑ: ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
Βόλος 30 και 31 Μαρτίου 2007
56. ΔΙΗΜΕΡΙΔΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Καλαμπάκα 8 -10 Ιουνίου 2007
57. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΑΓΙΔΕΣ - ΛΑΘΗ
Αθήνα 01 Δεκεμβρίου 2007
58. 18^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής
Πάτρα 19 και 20 Ιανουαρίου 2008
59. Επιμόρφωση εκπαιδευτικών
07 και 08 Φεβρουαρίου 2008
60. 11^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Πάτρα 7 -10 Μαΐου 2008
61. Παιδοπνευμονολογία εν πλώ V
5 -8 Σεπτεμβρίου 2008
62. ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ
Ζάκυνθος 19 -21 Σεπτεμβρίου 2008
63. ESSOP ANNUAL MEETING 2008
REYKJAVIK 8 - 10 OF OCTOBER 2008
64. 28^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής
Πάτρα 8 και 9 Νοεμβρίου 2008
65. 19^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής
Πάτρα 24 και 25 Ιανουαρίου 2009
66. Εξελίξεις στην Ογκολογία
Πάτρα 3 και 4 Απριλίου 2009
67. Β' Επιστημονική Δημερίδα Παθολογικής Ανατομικής
Πιερία, 23 - 24 Μαΐου 2009
68. `` Το σεισμικό τόξο που μας ενώνει ``
Λιθακιά Ζακύνθου 13-14 Νοεμβρίου 2009
69. 20^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής
Πάτρα 23 και 24 Ιανουαρίου 2010
70. Παρακολούθηση Σεμιναρίου Μοριακής Παθολογικής Ανατομικής
Αθήνα 2010
71. 12^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Θεσσαλονίκη 16 -19 Ιουνίου 2010
72. 13^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Καλαμάτα 13 -16 Ιουνίου 2012

Γ.2 ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΣ

- Συμμετοχή στα μετεκπαιδευτικά μαθήματα του Ιατρικού Συλλόγου Ζακύνθου, περιόδου 1997 – 1998
- Εκπαίδευση σπουδαστών ΙΕΚ Ζακύνθου για 364 συνολικά ώρες κατά τα έτη 1997 – 2001
- Εκπαιδευτικός στο 1^ο Τεχνικό και Επαγγελματικό Λύκειο Ζακύνθου από το διδακτικό έτος 1999 / 2000 με συμμετοχή στα προγράμματα Αγωγής Υγείας

Δ. ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ ΣΤΟ Ε.Σ.Υ. / ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ

- Δεν έχω προϋπηρεσία στο Ε.Σ.Υ.
- Ανέλαβα χρέη ελεγκτή ιατρού του Δημοσίου στην ΥΠΑΔ ΖΑΚΥΝ-ΘΟΥ επί δύομισι έτη από 01-01-2002 έως 30-06- 2004
- Ανέλαβα χρέη ιατρού εργασίας στην Τεχνική Εταιρεία ΘΕΜΕΛΗ τα έτη 2004 και 2005 (διάρκεια κατασκευής κρατικού αερολιμένος Ζακύνθου)
- Εκτελώ χρέη ιατρού εργασίας στο παράρτημα της εταιρείας MULTIRAMA του νομού από 15-07-2007 έως σήμερα.
- Εκτελώ χρέη ιατρού στο Ειδικό Εξεταστικό Κέντρο των φυσικώς αδυνάτων μαθητών κατά την διάρκεια των Πανελλαδικών Εξετάσεων συνεχόμενα από το έτος 2003.
- Εκτελώ χρέη ιατρού στους σχολικούς αγώνες Δημοτικών, Γυμνα-σίων και Λυκείων από το έτος 2003.

Από 17- 09- 1998 ιδιωτεύω ως Παθολογοανατόμος στην Ζάκυνθο. Είμαι η πρώτη και μοναδική έως τώρα Παθολογοανατόμος στο νησί και προσπαθώ να διεκπεραιώσω, με επίπονη προσπάθεια και επιστημονικό ζήλο, την ιστολογική εξέταση των βιοπτικών υλικών, με κύριο μέλημα πάντα την ορθότητα και εγκυρότητα της διαγνώσεως. Χρησιμοποιώ τις συνήθεις ιστοχημικές χρώσεις, όπου δε απαιτείται και ανοσο-ιστοχημικός έλεγχος απευθύνομαι σε εξειδικευμένα κατά περίπτωση Πανεπιστημιακά και Νοσοκομειακά Παθολογοανατομικά Εργαστήρια.

Οι ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις με αριθμό 3 και 4 προέρχονται από την παρούσα διδακτορική διατριβή.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κυτταρικός κύκλος ή κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης, αποτελείται από μία σειρά αυστηρά καθορισμένων γεγονότων τα οποία λαμβάνουν χώρα μέσα στο κύτταρο και οδηγούν στον διαχωρισμό και διπλασιασμό του. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει διαδικασίες ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου, περιλαμβανομένης της ορθότητας της αντιγραφής του γενετικού υλικού, της ανίχνευσης και διόρθωσης της γενετικής βλάβης καθώς και την πρόληψη της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης. Τα μοριακά γεγονότα που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο είναι καθορισμένα και κατευθυνόμενα. Η διαδικασία της ομαλής μετάβασης από την μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επομένη καθώς και ο έλεγχος της ακεραιότητας του DNA γίνεται σε ειδικά σημεία που λέγονται σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints).

Μεταξύ των μορίων που μετέχουν και σημαντικά καθορίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου συμπεριλαμβάνονται τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα των MCM πρωτεϊνών 2-7 (μινι-χρωμοσωμικές πρωτεΐνες διατήρησης) που δρουν ως αντιγραφικές ελικάσες καθώς και οι πρωτεΐνες αντιγραφής RPA. Το εξαμερές πρωτεϊνικό σύμπλεγμα των MCM λαμβάνει μέρος στην δημιουργία του προ-αντιγραφικού συμπλέγματος (pre- RC). Το τελευταίο αποτελείται από το σύμπλοκο αναγνώρισης του σημείου έναρξης της αντιγραφής του DNA (ORC), την πρωτεΐνη Cdc6 και τις πρωτεΐνες MCM 2-7 και παγιώνει την ειδικότητα συγκεκριμένων περιοχών χρωματίνης για την έναρξη της σύνθεσης του DNA στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και ως εκ τούτου αδειοδοτεί την έναρξη της αντιγραφής.

Το τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλεγμα RPA προσδένεται στο μονόκλωνο DNA (ssDNA) μαζί με το σύμπλεγμα των MCM πρωτεϊνών προσδίδοντας σταθερότητα στην δομή του. Επίσης ανιχνεύει, κατόπιν επιδράσεως ποικίλων γενοτοξικών παραγόντων, πιθανή βλάβη του DNA και συμβάλλει στην επιδιόρθωσή του συμμετέχοντας σε όλα τα επιδιορθωτικά μεταβολικά μονοπάτια.

Ο ρόλος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα καρκινώματα είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθόσον είναι γενικά αποδεκτό ότι η καρκινογένεση δημιουργείται ως αποτέλεσμα διαταραχής του κυτταρικού κύκλου, ιδίως λόγω απορύθμισης της αντιγραφής του DNA και πλημμελούς λειτουργίας των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Για τον λόγο αυτό, κυρίως τα τελευταία χρόνια οι επιστημονικές έρευνες έχουν στραφεί στην ανίχνευση της μοριακής βιολογίας των καρκινωμάτων. Πρόσφατα, θετικοί και αρνητικοί ρυθμιστές της αντιγραφής του DNA, μεταξύ των οποίων οι πρωτεΐνες MCM και RPA, αναδεικνύονται σαν νέοι βιολογικοί δείκτες που ενδεχόμενα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μαζικό έλεγχο, εκτίμηση της πρόγνωσης και καθορισμό της ανταπόκρισης στη θεραπεία για ένα ευρύ φάσμα ιστολογικών τύπων των νεοπλασμάτων.

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ο πιο συχνός καρκίνος σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας και αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από κακοήθεια του γεννητικού συστήματος στις Δυτικές Χώρες. Παρά την χειρουργική εξαίρεση και την εφαρμογή χημειοθεραπείας, οι μισές από τις πάσχουσες γυναίκες θα παρουσιάσουν υποτροπή ή θα πεθάνουν στα επόμενα δύο χρόνια. Για το λόγο αυτό ο καθορισμός παραγόντων για την πρόγνωση της κλινικής πορείας σε εξατομικευμένες περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητος.

Μέχρι στιγμής, υπάρχει μόνο μία πρόσφατη μελέτη που διερευνά τις πρωτεΐνες MCM σε νεοπλάσματα των ωοθηκών. Όμως αυτή η μελέτη επικεντρώθηκε κατ' αποκλειστικότητα στα ορώδη νεοπλάσματα και μελετά μόνο την έκφραση της πρωτεΐνης MCM-2. Πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η προγνωστική αξία των πρωτεϊνών MCM στον καρκίνο των ωοθηκών δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Επίσης δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια μελέτη η οποία να διερευνά το ρόλο των RPA πρωτεϊνών σε επιθηλιακά καρκινώματα ωοθηκών. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε και μελετήθηκε: α) η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών MCM-2 και MCM-5 σε σειρά όγκων χαμηλού κακοήθους δυναμικού και αδενοκαρκινωμάτων ωοθηκών και β) η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 σε αδενοκαρκινώματα ωοθηκών. Σκοπός είναι να καθοριστούν για πρώτη φορά οι πιθανές σχέσεις

τους με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67, άλλους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (p53, p27^{kip1}, p21^{WAF1} και pRb) και την επιβίωση των ασθενών.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

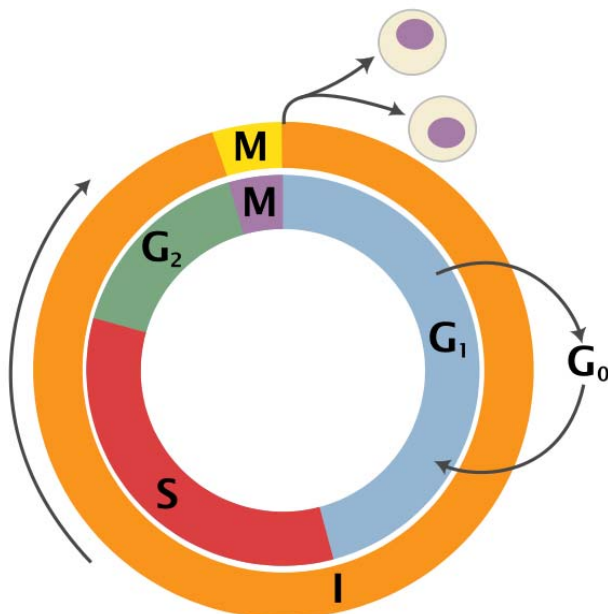
A. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ

Ο κυτταρικός κύκλος ή κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης, αποτελείται από μία σειρά γεγονότων τα οποία λαμβάνουν χώρα μέσα στο κύτταρο και οδηγούν στον διαχωρισμό και διπλασιασμό του (αντιγραφή). Αφορά στο χρονικό διάστημα μεταξύ μίας κυτταρικής διαίρεσης και της αμέσως επομένης. Ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης είναι μία ζωτικής σημασίας διαδικασία μέσω της οποίας ένα μονοκύτταρο γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται σε έναν ώριμο οργανισμό, καθώς και μία διαδικασία μέσω της οποίας ανανεώνονται τα σωματικά κύτταρα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε δύο περιόδους: α) την μεσόφαση κατά την διάρκεια της οποίας τα κύτταρα αυξάνονται, συσσωρεύουν θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την μίτωση και διπλασιάζουν το DNA τους και β) και την μιτωτική φάση κατά την διάρκεια της οποίας το κύτταρο διχάζεται σε δύο ανεξάρτητα κύτταρα, τα οποία καλούνται θυγατρικά κύτταρα. Η μεσόφαση αποτελείται από τρεις διακριτές φάσεις: α) G_1 , β) S (σύνθεση) και γ) G_2 (εικόνα 1). Η φάση M αποτελείται από δύο στενά συνδεδεμένες διεργασίες : την μίτωση όπου τα χρωματοσώματα του κυττάρου μοιράζονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα και στην κυτταροκίνηση, στην οποία το κυτταρόπλασμα χωρίζεται στα δύο και έτσι σχηματίζονται δύο ανεξάρτητα κύτταρα. Η ενεργοποίηση της κάθε φάσης εξαρτάται από την ομαλή εξέλιξη και την ολοκλήρωση της προηγούμενης. Τα κύτταρα τα οποία έχουν προσωρινά ή αναστρέψιμα σταματήσει την διαίρεση εισέρχονται σε μία κατάσταση ηρεμίας η οποία καλείται φάση G_0 . [134,135]

Μετά την ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης τρεις είναι οι προοπτικές του κυττάρου: α) εκ νέου κυτταρική διαίρεση β) προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) και γ) διαφοροποίηση. Εάν επακολουθήσει διαίρεση κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα ξεκινούν το νέο τους κύκλο από την μεσόφαση. Αν και τα διάφορα στάδια της μεσόφασης δεν είναι

μορφολογικά διακριτά, σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου διενεργούνται ξεχωριστές εξειδικευμένες και πολύπλοκες βιοχημικές διεργασίες, οι οποίες προετοιμάζουν το κύτταρο για την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου [135].

Φάση ηρεμίας (G_0 φάση) Ο όρος «μετα-μιτωτικά» χρησιμοποιείται μερικές φορές για να δηλώσει αμφότερα τα αδρανή και γηρασμένα κύτταρα. Τα μη διαιρούμενα κύτταρα στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εισέρχονται την φάση ηρεμίας G_0 από την φάση G_1 και μπορεί να παραμείνουν αδρανή για μεγάλο χρονικό διάστημα, πιθανόν επ' αόριστον (νευρώνες). Αυτό είναι πολύ συχνό για τα κύτταρα που είναι πλήρως διαφοροποιημένα. Η κυτταρική γήρανση εμφανίζεται σαν αποτέλεσμα της βλάβης του DNA ή σε καταστροφή του που θα δημιουργούσε μη βιώσιμους απογόνους.

Μεσόφαση

Πριν ένα κύτταρο εισέλθει στην κυτταρική διαίρεση χρειάζεται να πάρει θρεπτικά στοιχεία. Όλες οι προετοιμασίες γίνονται κατά την διάρκεια της μεσόφασης, η οποία ονομάζεται και προπαρασκευαστική φάση. Η μεσόφαση πραγματοποιείται σε τρία στάδια, G_1 , S, και G_2 . Αντιπροσωπεύει περίπου το 90% του κυτταρικού κύκλου.

Πίνακας 1: Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου καθώς και οι διαδικασίες που επιτελούνται σε κάθε μία από αυτές.

Φάση	Περιγραφή	Σύντμηση	
Ηρεμία γήρανση, διαφοροποίηση	Gap 0	G₀	Μία φάση ηρεμίας όπου το κύτταρο έχει αφήσει τον κύκλο και έχει σταματήσει την διαίρεση.
Μεσόφαση	Gap 1	G₁	Τα κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος στη φάση G ₁ . Το σημείο ελέγχου στην φάση G ₁ (<i>checkpoint</i>) διασφαλίζει ότι όλα είναι έτοιμα για την σύνθεση του DNA .
	Σύνθεση	S	Πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA
	Gap 2	G₂	Το κύτταρο συνεχίζει να αυξάνεται. Το σημείο ελέγχου στη G ₂ φάση διασφαλίζει ότι όλα είναι έτοιμα για την είσοδο στη φάση M (μίτωση) και την διαίρεση.
Κυτταρική διαίρεση	Μίτωση	M	Η κυτταρική ανάπτυξη σταματά σε αυτή τη φάση και η ενέργεια του κυττάρου επικεντρώνεται στην ομαλή διαίρεση σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Ένα σημείο ελέγχου στην μέση της μίτωσης (σημείο ελέγχου της μετά-φασης) διασφαλίζει ότι το κύτταρο είναι έτοιμο να ολοκληρώσει την διαίρεση.

G₁ φάση: Η πρώτη φάση της μεσόφασης από το τέλος της προηγούμενης μίτωσης μέχρι την έναρξη της σύνθεσης του DNA καλείται φάση G₁ ή αυξητική φάση. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης οι βιοσυνθετικές δραστηριότητες του κυττάρου, οι οποίες έχουν επιβραδυνθεί αρκετά κατά τη διάρκεια της φάσης M, επανέρχονται σε ένα υψηλό ποσοστό. Αυτή η φάση χαρακτηρίζεται από την σύνθεση αμινοξέων που σχηματίζουν αρχικά τις πρωτεΐνες και αργότερα τα ένζυμα που απαιτούνται στην φάση S και ιδίως εκείνα που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA. Η διάρκεια αυτής της φάσης ποικίλει ακόμα και μεταξύ διαφορετικών κυττάρων των ίδιων οργανισμών.

S φάση: Η επόμενη φάση S ξεκινά όταν αρχίζει η σύνθεση του DNA. Όταν ολοκληρωθεί όλα τα χρωματοσώματα έχουν διπλασιαστεί, και κάθε ένα από αυτά περιλαμβάνει δύο αδελφές χρωματίδες. Έτσι κατά την διάρκεια αυτής της φάσης η ποσότητα του DNA έχει διπλασιαστεί, αν και η πλοειδία του κυττάρου παραμένει ίδια. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης η σύνθεση διενεργείται το συντομότερο δυνατόν διότι τα εκτεθειμένα ζεύγη βάσεων είναι ευαίσθητα σε εξωτερικούς παράγοντες όπως φάρμακα, ή μεταλλαξιγόνα (νικοτίνη). Το απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα (23 χρωμοσώματα) έχει 9 δισεκατομύρια βάσεις και μήκος περίπου 1 μέτρο. Το διπλοειδές έχει μήκος 2 μέτρα και κατανέμεται σε 46 χρωμοσώματα.

G₂ φάση: Κατόπιν το κύτταρο εισέρχεται στη φάση G₂, η οποία προηγείται της εισόδου στην φάση M. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης λαμβάνουν ξανά χώρα οι βιοσυνθετικές δραστηριότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως την παραγωγή μικροσωληνίσκων, που απαιτούνται κατά την διάρκεια της μίτωσης. Η παρεμπόδιση της σύνθεσης πρωτεϊνών στη φάση αυτή αποτρέπει το κύτταρο από τη μιτωτική διαίρεση.

Φάση M /Μιτωτική φάση: Η σχετικά σύντομη φάση M αποτελείται από την πυρηνική διαίρεση (μίτωση) και την κυτταροκίνηση.

Μίτωση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα ευκαρυωτικό κύτταρο χωρίζει τα χρωματοσώματα του πυρήνα του σε δύο όμοια σύνολα σε δύο πυρήνες. Περιλαμβάνει την πρόφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την

τελόφαση. Συνήθως ακολουθείται άμεσα από την κυτταροκίνηση, η οποία χωρίζει τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα, τα οργανίδια και την κυτταρική μεμβράνη σε δύο κύτταρα που περιέχουν περίπου ίδια μερίδια αυτών των κυτταρικών συστατικών. Πραγματοποιείται έτσι η διαίρεση του αρχικού κυττάρου σε δύο θυγατρικά κύτταρα γενετικά όμοια, τόσο μεταξύ τους όσο και με το μητρικό κύτταρο. Αυτή η φάση αντιπροσωπεύει περίπου το 10% του κυτταρικού κύκλου.

Η διαδικασία της μίτωσης είναι πολύπλοκη και αυστηρά ρυθμισμένη. Η αλληλουχία των γεγονότων διαιρείται σε φάσεις που αντιστοιχούν στην ολοκλήρωση ενός συνόλου δραστηριοτήτων και της έναρξης του επομένου. Κατά την διάρκεια της μίτωσης τα ζεύγη των χρωματισσώματων συμπυκνώνονται και προσκολλώνται σε ίνες που τραβούν τις αδελφές χρωματίδες σε αντίθετες πλευρές του κυττάρου. Το κύτταρο μετά οδηγείται στην κυτταροκίνηση για να παράγει δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα.

Επειδή η κυτταροκίνηση εμφανίζεται συνήθως σε συνδυασμό με την μίτωση, η "μίτωση" συχνά ταυτίζεται με την φάση Μ. Εντούτοις, υπάρχουν πολλά κύτταρα όπου η μίτωση και η κυτταροκίνηση διενεργούνται χωριστά, διαμορφώνοντας μεμονωμένα κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες σε μία διαδικασία που ονομάζεται ενδο-αναδιπλασιασμός. Αυτό παρατηρείται κυρίως μεταξύ των μυκήτων, αλλά και σε διάφορες άλλες ομάδες. Ακόμα και στα ζώα η κυτταροκίνηση και η μίτωση μπορεί να εμφανιστούν ανεξάρτητα, όπως για παράδειγμα κατά την διάρκεια ορισμένων σταδίων εμβρυϊκής ανάπτυξης της Δροσόφιλα. Λάθη στην μιτωτική διεργασία μπορεί είτε να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης ή να προκαλέσουν μεταλλάξεις που μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. [98]

Μετα-μιτωτική φάση κυττάρου

Στον άνθρωπο τα περισσότερα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση αναστολής του πολλαπλασιασμού. Τούτη έχει τρεις μορφές:

Α) κατάσταση ηρεμίας G0 στην οποία απουσιάζουν οι απαραίτητες προϋποθέσεις για τον πολλαπλασιασμό, με κυρίαρχη την απουσία μιτογόνων ερεθισμάτων.

- B) κατάσταση τελικής διαφοροποίησης και
- Γ) κατάσταση πολλαπλασιαστικής γήρανσης.

Το κύτταρο θα επαναδιαιεθεί όταν υπερισχύσουν οι θετικοί έναντι των αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή μόλις αυξηθούν τα επίπεδα των κυκλινών και μειωθούν τα επίπεδα των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών [134,137].

2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΤΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει διαδικασίες ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου, οι οποίες εμπεριέχουν την ανίχνευση και την διόρθωση της γενετικής βλάβης καθώς και την πρόληψη της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης. Τα μοριακά γεγονότα που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο είναι καθορισμένα και κατευθυνόμενα, έτσι ώστε η κάθε διαδικασία να λαμβάνει χώρα σε διαδοχική τροχιά και να είναι ως εκ τούτου αδύνατον να αναστραφεί ο κύκλος [135,137].

Δύο ομάδες μοριακών ενώσεων ελέγχουν την ρύθμιση και οργάνωση του κυτταρικού κύκλου:

- α) οι κυκλίνες με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και
- β) οι αναστολείς αυτών.

2Α. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Δύο βασικές κατηγορίες ρυθμιστικών μορίων, οι κυκλίνες (κυκλίνη-s) και οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), καθορίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Οι Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt, και Paul M. Nurse πήραν το βραβείο NOBEL το έτος 2001 στην Ιατρική –Φυσιολογία για την ανακάλυψη αυτών των βασικών μορίων. Πολλά από τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις κυκλίνες και τις CDKs είναι συντηρημένα μεταξύ όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων, αλλά σε γενικές γραμμές οι πιο σύνθετοι οργανισμοί έχουν πιο πολύπλοκα συστήματα ελέγχου. Πολλά από τα σχετικά γονίδια

ταυτοποιήθηκαν αρχικά με την μελέτη του *Saccharomyces cerevisiae*. Η γενετική ονοματολογία στο ζυμομύκητα χρησιμοποιείται σε πολλά από αυτά τα γονίδια *cdc* που ακολουθούνται από έναν αριθμό ταυτοποίησης, πχ. *cdc25* ή *cdc20* [136].

Η ομάδα των **κυκλινών** που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο περιλαμβάνει τέσσερις διαφορετικές πρωτεΐνες, **τις κυκλίνη- A, κυκλίνη-B, κυκλίνη-D (1,2,3) και κυκλίνη-E**. Τούτες περικλείουν από κοινού μία αλληλουχία 100 αμινοξέων στην οποία γίνεται η πρόσδεση με τις αντίστοιχες κινάσες. Τα επίπεδα συγκέντρωσης των κυκλινών διαφέρουν σημαντικά στις διάφορες φάσεις του κύκλου λόγω της αποδόμησης και επανασύνθεσης τους σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Σε αυτή τη διαφορά συγκέντρωσης οφείλουν και την ονομασία τους. Σε μελέτες συγχρονισμένων κυττάρων εμβρύων βατράχου έχουν παρατηρηθεί τα εξής όσον αφορά τη συγκέντρωσή τους στα διάφορα στάδια του κύκλου: αύξηση συγκέντρωσης της κυκλίνης- B πριν την φάση M, αύξηση συγκέντρωσης της κυκλίνης -E πριν τη φάση S, αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλίνης-A προς το τέλος της S. Όσον αφορά την κυκλίνη D παρατηρείται σχεδόν σταθερή συγκέντρωσή της στο κυτταρόπλασμα καθόλη τη διάρκεια του κύκλου και ενδοπυρηνική εντόπισή της, κατόπιν επίδρασης εξωγενών παραγόντων, στη φάση G1 όπου και ενεργεί. Οι εξωγενείς παράγοντες μπορεί να δρουν ευοδωτικά (μιτογόνα ερεθίσματα) ή και ανασταλτικά (TGFβ) όσον αφορά την συγκέντρωση της κυκλίνης-D στον πυρήνα και καθορίζουν την διακίνηση της από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα [134].

Η αποδόμιση των κυκλινών επιτελείται ως εξής: ενεργοποιούνται λιγάσες – συνδετάσες ουμπικουϊτίνης οι οποίες και προκαλούν την σύνδεση τους με αλυσίδες ουμπικουϊτίνης και ακολουθεί ο καταβολισμός τους μέσω πρωτεασών (πρωτεόλυση).

Οι **κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDKs** είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης (και όχι τυροσίνης), έχουν όπως προαναφέρθηκε καταλυτική δράση και περιλαμβάνουν τις κινάσες CDK2, CDK4, CDK6 και την *cdc2*. Στο μόριό τους περικλείουν μία κοινή αλληλουχία αμινοξέων που αντιστοιχεί στο 40%

περίπου της δομής τους. Στο τμήμα αυτό συμπεριλαμβάνονται η αγκύλη ενεργοποίησης (activation loop) καθώς και η έλικα PSTAIRE που αποτελεί σημείο σύνδεσης με την αντίστοιχη κυκλίνη. Τα επίπεδα συγκέντρωσής τους παραμένουν σχεδόν σταθερά σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Επομένως η δραστηριότητα των συμπλόκων εξαρτάται από την συγκέντρωση άρα και διαθεσιμότητα των κυκλινών στις διάφορες φάσεις του κύκλου.

Οι κυκλίνες διαμορφώνουν τις ρυθμιστικές και οι CDKs τις καταλυτικές υπομονάδες ενός ενεργούς ετεροδιμερούς. Οι κυκλίνες αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη – στόχο του ετεροδιμερούς και δεν έχουν καμία καταλυτική δραστηριότητα, ενώ οι CDKs είναι ανενεργείς ελλείψει της εταιρικής / συνδεδεμένης κυκλίνης.

Τα ετεροδιμερή τα οποία προκύπτουν είναι τα εξής:

κυκλίνη-A / CDK2, κυκλίνη-B / CDC2, κυκλίνη-D / CDK4, κυκλίνη-D / CDK6 και κυκλίνη-E / CDK2.

Τα σύμπλοκα αυτά δρουν σε διαφορετικές φάσεις του κύκλου. Συγκεκριμένα:

G0-G1: δρουν τα σύμπλοκα κυκλίνη-D / CDK4 και κυκλίνη-D/CDK6 τα οποία είναι απαραίτητα για την μεταγραφική δραστηριότητα των παραγόντων της οικογενείας E2F μέσω της αναστολής της δράσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος.

G1-S : το σύμπλοκο κυκλίνη-E / CDK2

S: το σύμπλοκο κυκλίνη-A / CDK2

G2: το σύμπλοκο κυκλίνη-A / CDC2

M: το σύμπλοκο κυκλίνη-B / CDC2.

Όταν οι CDKs ενεργοποιούνται από την συνδεδεμένη κυκλίνη εκτελούν μία κοινή βιοχημική αντίδραση που καλείται φωσφορυλίωση και ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί πρωτεΐνες – στόχους με σκοπό να ενορχηστρώσουν τη συντονισμένη έξοδο του κυττάρου από την προηγούμενη φάση και την είσοδο του στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου [137,138,140].

2Α1. ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

ΚΥΚΛΙΝΗΣ- CDKs

Στην φάση G1 όταν λαμβάνουν ένα προ-μιτωτικό εξωκυττάριο σήμα τα σύμπλοκα κυκλίνη-CDK γίνονται ενεργά για να προετοιμάσουν το κύτταρο για την φάση S, προάγοντας την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων που με την σειρά τους επάγουν την έκφραση των S κυκλινών και των ενζύμων που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA. Τα σύμπλοκα κυκλίνη-CDK της φάσης G1 επίσης προωθούν την καταστροφή των μορίων που λειτουργούν ως ανασταλτικοί παράγοντες της φάσης S, στοχοποιώντας τα για σύνδεση με την ουμπικουΐτίνη και κατόπιν για πρωτεόλυση [140].

Τα ενεργά σύμπλοκα cyclin-CDK της φάσης S φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που συγκροτούν τα προαντιγραφικά σύμπλοκα, τα οποία συναρμολογούνται κατά την διάρκεια της φάσης G1 στα σημεία έναρξης της αντιγραφής (ORC +cdc6 +cdt1 + MCM2-7). Η φωσφορυλίωση αυτή εξυπηρετεί δύο σκοπούς: να ενεργοποιεί κάθε σχεδόν συναρμολογημένο προαντιγραφικό σύμπλοκο και να προλαμβάνει την δημιουργία νέων συμπλόκων. Αυτό διασφαλίζει ότι κάθε τμήμα του γονιδιώματος του κυττάρου θα αντιγραφεί μία φορά και αποτελεσματικά. Αν η αντιγραφή δεν είναι αποτελεσματική, χάνεται πληροφορία. Ο λόγος για την πρόληψη των χασμάτων στην αντιγραφή είναι ξεκάθαρος γιατί τα θυγατρικά κύτταρα που χάνουν σύνολο ή μέρος των κρίσιμων γονιδίων θα αποβιώσουν.

Τα σύμπλοκα cyclin-CDKs της φάσης M τα οποία συντίθενται αλλά αδρανοποιούνται κατά την διάρκεια των φάσεων S και G2, προωθούν την έναρξη της μίτωσης με την διέγερση δευτερευουσών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην συμπύκνωση των χρωματοσωμάτων και στην δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου. Ένα σημαντικό σύμπλεγμα που ενεργοποιείται κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας είναι μία λιγάση ουμπικουΐτινης, γνωστή ως σύμπλεγμα προώθησης της ανάφασης (APC), η οποία προωθεί την πρωτεόλυση των δομικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τους χρωμοσωμικούς κινητοχώρους. Η APC επίσης επάγει την πρωτεόλυση των μιτωτικών

κυκλινών, για να εξασφαλίσει την πρόοδο της τελόφασης και της κυτταροκίνησης [137,138].

2A2. ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΗΣ - CDK

Η κυκλίνη D είναι η πρώτη κυκλίνη που παράγεται στον κυτταρικό κύκλο σε απάντηση εξωκυττάρων ερεθισμάτων (πχ αυξητικός παράγοντας). Η κυκλίνη D δεσμεύει την υπάρχουσα κινάση CDK4, δημιουργώντας το σύμπλεγμα cyclin D-CDK4. Το σύμπλεγμα με την σειρά του φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η υπερφωσφορυλιωμένη Rb αποσυνδέεται από το σύμπλεγμα E2F/DP1/Rb (το οποίο ήταν δεσμευμένο στα E2F υπεύθυνα γονίδια, μπλοκάροντας τα αποτελεσματικά), ενεργοποιώντας το E2F. Η ενεργοποίηση του E2F έχει σαν αποτέλεσμα την αντιγραφή διαφόρων γονιδίων όπως κυκλίνη E, κυκλίνη A, DNA πολυμεράση, θυμιδίνη – κινάση κλπ.

Η κυκλίνη E που συντίθεται στο τέλος της G1 φάσης συνδέεται με την CDK2, δημιουργώντας το σύμπλεγμα κυκλίνη E-CDK2, το οποίο ωθεί το κύτταρο από την φάση G₁ στην S (G₁/S μετάβαση). Η κυκλίνη A συντίθεται κατά τη διάρκεια της S και G₂ φάσης. Η κυκλίνη B συντίθεται στην G₂ και M φάση. Η κυκλίνη B μαζί με την κινάση cdc2 (cdc2 - fission yeasts / CDK1 – mammalia) δημιουργεί το σύμπλεγμα B-cdc2, το οποίο προάγει τη μετάβαση από την φάση G₂ στην M. Η ενεργοποίηση του συμπλέγματος B-cdc2 προκαλεί διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και έναρξη της πρόφασης και κατά συνέπεια η απενεργοποίησή του προκαλεί την έξοδο του κυττάρου από την μίτωση. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα κυκλίνης – κινάσης απαιτεί φωσφορυλίωση (στη θρεονίνη) από μία άλλη ρυθμιστική κινάση την κινάση ενεργοποίησης των CDK (CDK-activating kinase ή CAK). Η κινάση CAK είναι ένα σύμπλεγμα το οποίο αποτελείται από την κυκλίνη H και τις CDK7 πρωτεΐνες. Από τη στιγμή αυτή τα επίπεδα της CAK επηρεάζουν την δραστηριότητα των CDKs. Ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης είναι η απενεργοποίηση της CDK από την φωσφορυλίωση μιας δικής της δεσμευμένης θέσης ATP από μια άλλη ρυθμιστική κινάση. Η συγκεκριμένη ενέργεια από αυτή την κινάση δεν είναι συχνή και έχει διπλή ειδικότητα τόσο για την

τυροσίνη όσο και την θρεονίνη. Η απενεργοποιημένη αποφωσφορυλίωση του δικού της δεσμευμένου ATP μπορεί να επανενεργοποιηθεί από μια διπλής ειδικότητας φωσφατάση που ανήκει στην Cdc25 οικογένεια. Στην πραγματικότητα η αποφωσφορυλίωση από αυτές τις φωσφατάσες μπορεί να αποτελέσει το ευαίσθητο βήμα για την περαιτέρω πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η σύνθεση και η ενεργοποίηση αυτών των CDKs ρυθμίζεται σαν απάντηση σε διττά μιτωτικά και αντιμιτωτικά σήματα [137,138].

2B. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΩΝ – CDKS

Τρεις οικογένειες γονιδίων δρουν ανασταλτικά στο ρόλο των CDKs .

A) η οικογένεια WAF1/CIP1 / (p21)

B) η οικογένεια KIP (p27,p57) και

Γ) η οικογένεια INK4a (p14,p15,p16 και p18).

Επειδή αυτά τα γονίδια έχουν αποφασιστικό ρόλο στην πρόληψη σχηματισμού όγκων είναι γνωστά σαν ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Οι οικογένειες **CIP/KIP** αναστέλλουν τη δράση των κινασών CDK2 και CDC2 αδρανοποιώντας τα αντίστοιχα συμπλέγματα κυκλινών-κινασών στην φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου.

Η οικογένεια INK4a δρα ανασταλτικά στη δράση των κυκλινών CDK4/6.

Με την επίδραση ανασταλτικών ερεθισμάτων (πχ σύνδεση του μετατρεπτικού παράγοντα των όγκων TGFβ στους υποδοχείς επιθηλιακών κυττάρων) αυξάνονται τα επίπεδα του παράγοντα p15, ο οποίος αναστέλλει την σύνθεση και την δράση των ετεροδιμερών κυκλίνης D-CDK4/6, προκαλώντας παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G₁ και επομένως μη μετάβαση στην φάση S. Με την επίδραση των ιδίων ερεθισμάτων αυξάνουν και τα επίπεδα των παραγόντων p21 και p27, προκαλώντας αναστολή δράσης των αντίστοιχων ετεροδιμερών κυκλίνης E-CDK2, κυκλίνης A-CDK2, κυκλίνης A-CDC2 και κυκλίνης B-CDC2.

Αντίθετα μιτογόνα ερεθίσματα μειώνουν την ενδοπυρηνική συγκέντρωση των παραγόντων p21 και p27 με αποτέλεσμα να μειώνεται η ανασταλτική τους

δράση επί των ετεροδιμερών E-CDK2, A-CDK2, A-CDC2 και B-CDC2 και κατά συνέπεια να επιτρέπεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου [135,138].

2B1. ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Τα σημεία ελέγχου χρησιμοποιούνται από το κύτταρο για να παρακολουθούν και να ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Τα σημεία ελέγχου εμποδίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε καθορισμένα σημεία επιτρέποντας την επαλήθευση των απαραίτητων διαδικασιών και την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Το κύτταρο δεν μπορεί να προχωρήσει στην επόμενη φάση μέχρις ότου ολοκληρωθούν οι απαραίτητες διαδικασίες. Αρκετά σημεία ελέγχου έχουν σχεδιαστεί για να εξασφαλίσουν ότι το τραυματισμένο ή ελλιπές DNA δεν μεταφέρεται προς τα θυγατρικά κύτταρα. Αναφέρονται τα εξής σημεία ελέγχου μετάβασης φάσεων : τα G1-S (περιοριστικό σημείο) , G2- M και M (σε μικρότερη συχνότητα) [24,98].

A) Περιοριστικό σημείο R (σημείο ελέγχου μετάβασης G1/S)

Το σημείο αυτό είναι το κυριότερο και εντοπίζεται προς το τέλος της φάσης G1 και βασική του αποστολή είναι να ελέγξει την ακεραιότητα του DNA που πρόκειται να αναδιπλασιαστεί ώστε να αποφευχθεί η αντιγραφή παθολογικού DNA και η μεταφορά του στα θυγατρικά κύτταρα. Στο σημείο αυτό, εφόσον διαπιστωθεί παθολογία, σταματά ο κύκλος μέχρις να ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση της βλάβης του DNA.

Η πρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για την φύλαξη της πύλης μετάβασης G1/S είναι **η πρωτεΐνη του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (pRb)** και ελέγχει τα δρώμενα ανάλογα με τα επίπεδα φωσφορυλίωσής της. Χαρακτηριστικά η πρωτεΐνη αυτή είναι:

Αποφωσφορυλιωμένη στη φάση G0 ,

Υποφωσφορυλιωμένη στην πρώιμη - μέση φάση G1 με την επίδραση των ετεροδιμερών Κυκλίνης D- CDK4/6 (απαραίτητη η επίδραση μιτογόνων ερεθισμάτων)

Υπερφωσφορυλιωμένη στη μέση- όψιμη φάση G1 με την επίδραση των ετεροδιμερών Κυκλίνης E - CDK2.

Η υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης pRb είναι απαραίτητη για την μετάβαση στην φάση S.

Κατά την διάρκεια της φάσης G1 η pRb είναι συνδεδεμένη και με την ομάδα μεταγραφικών παραγόντων **E2F**, μέλη της οποίας συνδέονται με το DNA, αλλά είναι ανενεργή λόγω της ταυτόχρονης δέσμευσής τους με την pRb. Στην υπερφωσφορυλιωμένη μορφή η pRb αποδεσμεύεται από το σύμπλεγμα E2F με αποτέλεσμα το τελευταίο να μπορεί να προάγει τη μεταγραφή γονιδίων (DNA πολυμεράση, θυμιδίνη – κινάση), με την συμβολή της RNA πολυμεράσης. Χρονικά η μεταγραφική περίοδος ξεκινά από το σημείο R και ολοκληρώνεται με την είσοδο στην φάση S. Τότε τα ετεροδιμερή κυκλίνης A-CDK2 φωσφορυλιώνουν την ομάδα των μεταγραφικών παραγόντων **E2F**, την διασπούν και προκαλείται αποδόμησή τους μέσω της οδού της ουμπικουΐτινης.

Η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος είναι υψίστης σημασίας για τον κυτταρικό κύκλο και επιτυγχάνεται με την συνέργεια ποικίλων και πολύπλοκων, αυστηρά ρυθμιζόμενων μεταβολικών μονοπατιών. Τα κυριότερα από αυτά είναι: το μονοπάτι του Myc, το μονοπάτι του TGFβ και το μονοπάτι που συμμετέχει η κυκλίνη D1.

B) Σημείο ελέγχου G2 – M

Ενεργοποιείται όταν η σύνθεση του DNA είναι αλλοιωμένη ή παρεμποδίζεται. Στη φάση αυτή δημιουργείται το σύμπλεγμα κυκλίνης B- CDC2, το οποίο φωσφορυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες όπως οι λαμίνες , αναγκαίες για την μίτωση. Ανασταλτικό ρόλο έχει η πρωτεΐνη p21 που ανήκει στην οικογένεια αναστολέων WAF1/CIP1.

Γ) Σημείο ελέγχου S.

Στη φάση αυτή δημιουργείται το σύμπλεγμα κυκλίνης E- CDC2 το οποίο ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ιστόνης, απαραίτητης για την σύνδεση των τμημάτων του γενετικού υλικού.

Δ) Σημείο ελέγχου M ή σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου.

Σε αυτή τη φάση πρέπει να καθηλωθούν τα χρωματοσώματα στην μιτωτική άτρακτο και να επιτευχθεί ίση κατανομή τους στα δύο θυγατρικά κύτταρα.[24,98].

3. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ DNA – ΜΟΝΤΕΛΟ ΑΔΕΙΟΔΟΤΗΣΗΣ

Για την παραγωγή δύο θυγατρικών κυττάρων, τα οποία κληρονομούν ένα τέλειο αντίγραφο του γενετικού υλικού που ενυπάρχει μέσα στο μητρικό κύτταρο, η κυτταρική διαίρεση θα πρέπει να επιτύχει δύο βασικούς στόχους. Πρώτον, το χρωμοσωμικό DNA θα πρέπει να αντιγραφεί επακριβώς χωρίς λάθη, ελλείψεις ή διπλασιασμούς και δεύτερο τα δύο αντίγραφα να κληροδοτηθούν στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Η ακρίβεια με την οποία εκτελούνται αυτές οι δύο διαδικασίες είναι σημαντική για τους πολυκύτταρους οργανισμούς, στους οποίους οποιεσδήποτε αλλαγές στο γονιδίωμα θα μπορούσαν να προκαλέσουν την γέννηση νεοπλασιών θέτοντας σε κίνδυνο τη ζωή όλου του οργανισμού.

Το πρώτο από τα προβλήματα τα οποία παρουσιάζει η διαδικασία της αντιγραφής του DNA είναι το πως τα ευκαρυωτικά κύτταρα διασφαλίζουν ότι το χρωμοσωμικό τους DNA είναι επακριβώς διπλασιασμένο κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου.

Ένας μεγάλος αριθμός «αντιγραφικών εστιών» (10^3 - 10^5) επιστρατεύονται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς για το διπλασιασμό του γονιδιώματος, η λειτουργία των οποίων ρυθμίζεται πολύ αυστηρά. Το ερώτημα που δημιουργείται είναι πως το κύτταρο αντιλαμβάνεται ότι ένα κομμάτι του γονιδιώματος έχει ήδη αντιγραφεί στη διάρκεια της φάσης S. [8]

Το πρόβλημα αυτό λύνεται με το να τοποθετείται ένας δείκτης μέσω του οποίου να ξεχωρίζεται το αντεγραμμένο από το μη-αντεγραμμένο DNA. Η ύπαρξη ενός τέτοιου δείκτη ή δεικτών αρχικά είχε υποτεθεί από τα πειράματα των Rao και Johnson [92] . Σε κυτταρικά υβρίδια στη φάση G1-G2 ο μη αντεγραμμένος πυρήνας περνάει κατευθείαν στη φάση S, ενώ το G2 DNA δεν διπλασιάζεται ξανά παρά μόνο όταν το υβρίδιο περάσει από μίτωση. Άρα ο

πυρήνας που βρίσκεται σε φάση G2 δεν μπορεί να αντιγραφεί ξανά. Η πειραματική δουλειά με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από αυγά *Xenopus* εξέλιξε αυτή την ιδέα και πρότεινε ένα μοντέλο κατά το οποίο οι αντιγραφικές εστίες «αδειοδοτούνται» προς πολλαπλασιασμό αργά προς το τέλος της μίτωσης και στη διάρκεια της φάσης G1 αλλά μόλις το DNA αντιγραφεί οι αδειοδοτικοί μηχανισμοί απομακρύνονται [92]. Με το να ξεχωρίζεται η αντιγραφική διαδικασία σε δύο μη-επικαλυπτόμενες φάσεις δηλαδή μία πρώτη φάση που επιτρέπει τη αδειοδότηση αντιγραφής και μία δεύτερη φάση, η οποία επιτρέπει την έναρξη της αντιγραφής και εμποδίζει την αντιγραφή των ήδη αντιγραμμένων εστιών μπορεί δυνητικά να εξηγήσει το πως τα κύτταρα εξασφαλίζουν τον επακριβή διπλασιασμό του γενετικού υλικού κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Το μοντέλο αδειοδότησης σήμερα έχει καθοριστεί επαρκώς και το συνθέτουν τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά:

- Πρώτον, οι αντιγραφικές εστίες αδειοδοτούνται προς αντιγραφή με τη σταθερή πρόσδεση των πρωτεϊνών του συμπλέγματος διατήρησης των μινι-χρωμοσωμάτων 2-7 (Mcm 2, 3,4,5,6 και 7). Οι Mcm 2-7 απαρτίζουν ένα πολύ βασικό συστατικό του προ-αντιγραφικού συμπλέγματος (pre-RC) το οποίο βρίσκεται στις αντιγραφικές εστίες κατά τη διάρκεια της φάσης G1.
- Δεύτερον, η πρόσδεση των Mcm 2-7 στις εστίες είναι ουσιαστική για την έναρξη του ζεύγους της αντιγραφικής φουρκέτας.
- Τρίτον, η αδειοδότηση των εστιών και η στρατολόγηση των Mcm 2-7 στις εστίες περιορίζεται αργά προς το τέλος της μίτωσης και στη φάση G1 του κύκλου.
- Τέταρτον, οι πρωτεΐνες Mcm 2-7 απομακρύνονται από τις εστίες με την έναρξη της αντιγραφής του DNA, πιθανότατα με το να μετακινούνται μπροστά από την αντιγραφική φουρκέτα. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι το αντιγραμμένο DNA δεν αντιγράφεται εκ νέου.

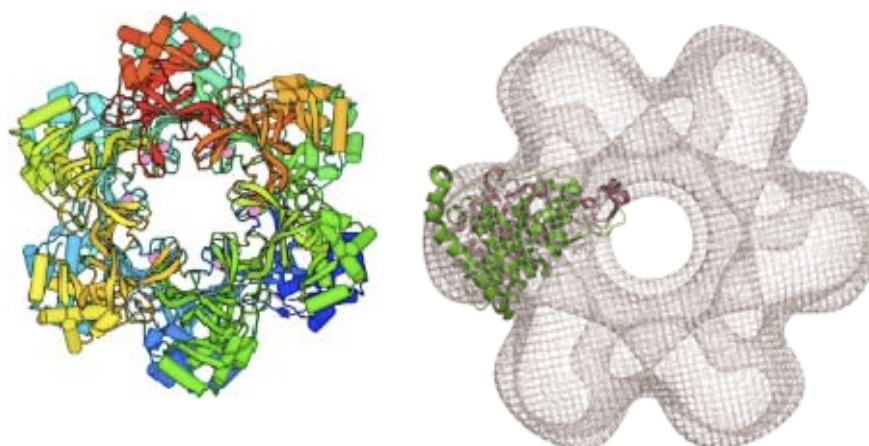
Αυτά τα χαρακτηριστικά εξηγούν καλά γιατί το DNA αντιγράφεται μόνο μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η παρου-σία ή η απουσία αδειοδοτημένων εστιών έχει βαθύτερες επιπτώσεις στη

βιολογία του κυττάρου καθώς πιθανά παίζει ρόλο και στον καθορισμό του πολλαπλαστικού δυναμικού του κυττάρου [14,31].

3Α. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΔΕΙΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ DNA - MCM

3Α1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ MCM 2-7

Το σύμπλεγμα Mcm 2-7 αποτελείται από έξι πανομοιότυπες πρωτεΐνες οι οποίες είναι πολύ συντηρημένες στα ευκαρυωτικά κύτταρα(εικόνα 2). Ανήκουν στην οικογένεια AAA + ATP (ΑΤΡάσες συνδεδεμένες με ποικίλες ενδοκυττάριας δραστηριότητες). Κάθε πρωτεΐνη έχει ένα σχετικά συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο το οποίο περικλείει την περιοχή της ΑΤΡασης και έχει ομολογία με τις εξαμερείς ελικάσες. Πολλά συμπλέγματα έχουν περιγραφεί που περιλαμβάνουν διαφορετικούς συνδυασμούς των ελικασών Mcm 2-7. Ένα απομονωμένο εξαμερές σύμπλεγμα το οποίο περιλαμβάνει τις Mcm 4, 6 και 7 έχει περιορισμένη δραστηριότητα *in vitro* ελικάσης 3' προς 5'. Εντούτοις, μόνο το εξαμερές το οποίο τις περιλαμβάνει όλες τις Mcm 2-7 μπορεί να επιτύχει αδειοδότηση αντιγραφής του DNA σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα αυγού *Xenopus*. Και οι έξι πρωτεΐνες απαιτούνται για την πλήρη δραστηριότητα ΑΤΡασης *in vitro* ενώ, και οι έξι περιοχές ΑΤΡασης απαιτούνται για τη βιωσιμότητα του σακχαρομύκητα.



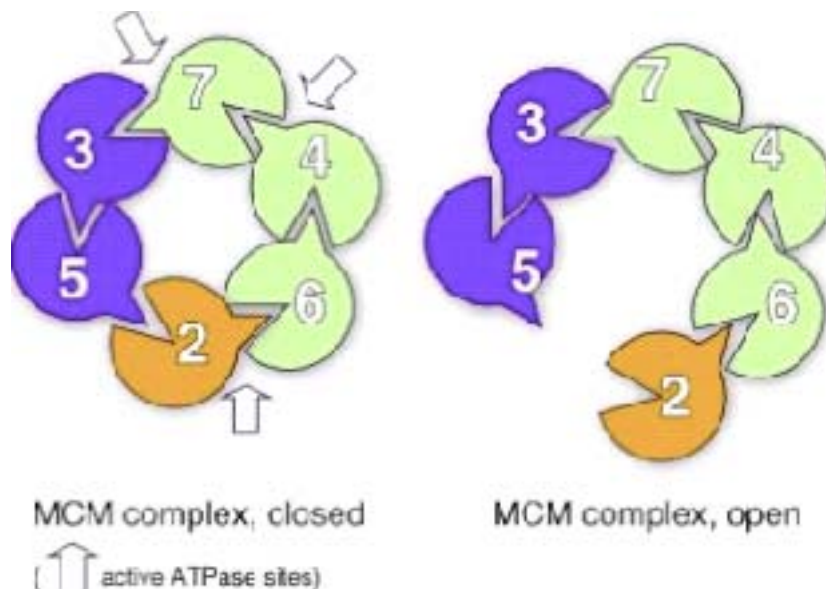
Εικόνα 2:Δομή εξαμερούς Mcm [117]

Πειράματα ανοσακατακρήμνισης χρωματίνης δείχνουν ότι οι ελικάσες Mcm 2-7 εντοπίζονται στην αντιγραφική φουρκέτα καθώς αυτή προχωρά κατά μήκος του αντιγραφόμενου DNA, ενώ η παρεμπόδιση της δραστηριότητας των Mcm 2-7 κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε άμεση διακοπή της σύνθεσης του DNA. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως οι Mcm 2-7 λειτουργούν ως ελικάσες που ξεδιπλώνουν το DNA μπροστά από την αντιγραφική φουρκέτα. Αυτό το γεγονός προϋποθέτει βεβαίως ότι οι Mcm 2-7 απομακρύνονται τελικά από την αντιγραφική φουρκέτα. Η απομάκρυνση των αδειοδοτικών παραγόντων από την αντιγραφική εστία είναι όπως προείπαμε μία βασική συνθήκη του μοντέλου αδειοδότησης αντιγραφής του DNA [91,117,126].

Τα αρχαιοβακτήρια διαθέτουν πρωτεΐνες πολύ ομόλογες με τις MCM/P1 των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η μοναδική πρωτεΐνη MtMCM του *Methanobacterium autotrophicum* δημιουργεί δωδεκαμερή με δραστηριότητα *in vitro* ελικάσης. Η κρυσταλλική δομή του αμινοτελικού άκρου της MtMCM δείχνει ότι πρόκειται για μία διπλή εξαμερή δομή με ένα μεγάλο θετικά φορτισμένο σωληνώδη σχηματισμό (κανάλι) στο κέντρο ο οποίος είναι αρκετά ευρύς ώστε να περικλείει τη διπλή έλικα του DNA. Το καρβοξυτελικό άκρο που περιέχει περιοχή ΑΤΡασης λείπει από τη δομή αυτή αλλά φαίνεται ωστόσο να δημιουργεί άλλο έναν λοβό. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και 3D Modeling (τρισδιάστατης αναπαράστασης) που αναδεικνύουν ότι η MtMCM έχει δύο λοβούς και ένα μεγάλο κεντρικό κανάλι [13,31].

Αυτή η δομή προσδίδει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις στη λειτουργία των ευκαρυωτικών Mcm 2-7 και του ρόλου τους στην αδειοδότηση της αντιγραφικής εστίας. Το μοντέλο αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA προβλέπει ότι η στρατολόγηση των Mcm 2-7 στις αντιγραφικές εστίες πρέπει να είναι αυστηρώς ρυθμιζόμενη και η πρόσδεσή τους σταθερή. Τα συμπλέγματα Mcm 2-7 τα οποία προσδένονται στο DNA αργά κατά τη μίτωση πρέπει να παραμείνουν συνδεδεμένα κατά τη διάρκεια των φάσεων G1 και S. Είναι σημαντικό επίσης το γεγονός ότι μετά την έναρξη της αντιγραφικής

διαδικασίας οι Mcm 2-7 δεν θα ξαναπροσδεθούν στο DNA. Τέτοια προβλήματα λύνονται αν υποθέσουμε πως η πρόσδεση των Mcm 2-7 στο DNA περιλαμβάνει την εγκόλπωσή του δεύτερου από το εξαμερές των Mcm 2-7. Τέτοιου είδους πρόσδεση στο DNA είναι σταθερή και μπορεί να ρυθμιστεί με την ελεγχόμενη δραστηριότητα ενός μορίου το οποίο κατευθύνει τις Mcm 2-7 με το να ανοίγει το εξαμερές και να το αγκιστρώνει γύρω από το DNA (εικόνα 3). Η δομή της MtMCM θυμίζει πολύ τη δομή του T αντιγόνου του ιού SV-40, το οποίο είναι και η αντιγραφική ελικάση του ιού αυτού. Το T αντιγόνο του SV-40 είναι και αυτό δίκλωνο με ένα κανάλι στο κέντρο. Το T αντιγόνο του SV-40 διαθέτει επίσης κανάλια εξόδου μέσω των οποίων το μονόκλωνο DNA διοχετεύεται προς την έξοδο καθώς η ελικάση προχωρεί προς τα εμπρός. Τέτοια στοιχεία μπορούν να αναγνωριστούν και στη δομή της MtMCM. Πριν την έναρξη της αντιγραφής το T αντιγόνο του SV-40 ενθυλακώνει και τις δύο αλυσίδες του DNA γεγονός που στην περίπτωση των Mcm 2-7 μπορεί να αντιστοιχεί με την αδειοδότηση πριν την έναρξη της αντιγραφής. Κατά την έναρξη η μία από τις μονόκλωνες αλυσίδες διοχετεύεται μέσω των πλευρικών καναλιών ενώ η άλλη εξάγεται από τη δομή αυτή της ελικάσης από την επιφάνεια επαφής των εξαμερών [46,48].



Εικόνα 3. Πρόσδεση των MCM στο DNA [46]

Υπάρχουν ωστόσο κάποιες παρατηρήσεις οι οποίες δεν ταιριάζουν με το μοντέλο λειτουργίας των Mcm 2-7 που τις θέλει απλές ελικάσες της αντιγραφικής φουρκέτας. Πρώτον, κάποιος θα μπορούσε να σκεφτεί ότι μόνο ένα διπλό εξαμερές χρειάζεται σε κάθε αντιγραφική εστία, εντούτοις ο αριθμός των εξαμερών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι πολύ μεγαλύτερος: 10-40 εξαμερή Mcm 2-7 είναι παρόντα σε κάθε εστία. Η στρατολόγηση των Mcm 2-7 στη χρωματίνη εξαρτάται από το σύμπλεγμα αναγνώρισης της αντιγραφικής εστίας (ORC), το οποίο, όπως θεωρείται, δεσμεύεται ειδικά σε αυτές. Το ORC στρατολογεί δύο επιπλέον πρωτεΐνες- τις Cdc6 και Ctd1- οι οποίες μαζί διευκολύνουν την σύνδεση των Mcm 2-7. Εντούτοις, έρευνες σε κύτταρα HeLa και στο *Xenopus* δείχνουν ότι το σύμπλεγμα Mcm 2-7 φορτώνεται σε χρωμοσωμικές περιοχές κάπως απομακρυσμένες από το ORC. Μετά από τα πρώτα συμπλέγματα τα οποία στρατολογούνται στο DNA, η στρατολόγηση των επόμενων Mcm 2-7 απαιτεί υδρόλυση ATP από το ORC. Η κατανομή των Mcm 2-7 στη χρωματίνη σαφώς δεν ταιριάζει με εκείνη μίας απλής αντιγραφικής ελικάσης, η οποία θα έπρεπε να στρατολογείται στις αντιγραφικές εστίες σε δύο αντίγραφα ανά θέση. [46,48,126]

Μία δεύτερη παρατήρηση αφορά στο γεγονός ότι παρόλο που κάποια συμπλέγματα Mcm 2-7 συνεντοπίζονται στις αντιγραφικές εστίες, η πλειοψηφία τους δεν βρίσκεται σε θέσεις σύνθεσης του DNA.

Υπάρχουν κάποιες πιθανές εξηγήσεις για αυτή την παράδοξη κατανομή των Mcm 2-7 πάνω στα χρωμοσώματα. Μία πιθανότητα είναι ότι το σύμπλεγμα Mcm 2-7 δε δρα σαν μία ελικάση αλλά σαν μία σταθερή αντλία στο DNA, η οποία κατά τη διάρκεια της αντιγραφής ακινητοποιεί τις αντιγραφικές φουρκέτες πάνω στο DNA. Από την τάση που εξασκείται μέσω των Mcm 2-7 το DNA υπερελικώνεται και αυτό το γεγονός προμηθεύει την απαιτούμενη ενέργεια μπροστά από τις αντιγραφικές πολυμεράσες, καθιστώντας την ύπαρξη ελικάσης μη-απαραίτητη στην αντιγραφική φουρκέτα. Για να γίνει κάτι τέτοιο βέβαια θα πρέπει το DNA μεταξύ της πολυμεράσης και του Mcm 2-7 να προστατεύεται από τη δράση τοποϊσομερασών. [35,44]

Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι ενώ ένα μικρό ποσοστό των Mcm 2-7 απαιτείται για την αδειοδότηση της αντιγραφής, η πλειοψηφία των Mcm 2-7 δε συμμετέχει στη σύνθεση του DNA και είτε έχει κάποια εντελώς διαφορετική λειτουργία ή απαιτείται για την αντιμετώπιση κάποιας έκτακτης ανάγκης. Με την πρώτη εξήγηση συμφωνεί το γεγονός ότι σχεδόν φυσιολογικοί ρυθμοί σύνθεσης μπορούν να επιτευχθούν στο *Xenopus* μόλις μόνο με 1-2 εξαμερή Mcm 2-7 ανά αντιγραφική εστία.

Παρόλο που το Cdc6 απαιτείται για τη στρατολόγηση των Mcm 2-7 στο DNA, η συγγενειά του για τις αντιγραφικές εστίες μειώνεται μετά τη στρατολόγηση των πρώτων εξαμερών Mcm 2-7. Αυτό θα μπορούσε να εξυπηρετεί στο γεγονός ότι σε περιπτώσεις κυτταρικής ένδειας σε Mcm 2-7 κάθε αντιγραφική εστία λαμβάνει ένα απαιτούμενο ελάχιστο σε Mcm 2-7 ώστε να μπορέσει να υποστηρίξει την αντιγραφή της. Ποια είναι ωστόσο η λειτουργία της περίσσειας των Mcm 2-7; Μία πιθανότητα είναι ότι ενεργοποιούν τα σημεία ελέγχου μέσα στη φάση S. Η ανθρώπινη Mcm7 προσδένεται στο μόριο ATRIP, την πρωτεΐνη εκείνη που δεσμεύεται και ενεργοποιεί την κινάση ATR. Η κινάση ATR, όπως αναφέρεται και παρακάτω, συμμετέχει στη σηματοδότηση σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που ενεργοποιείται όταν η αντιγραφή του DNA καθίσταται προβληματική.

Η παρουσία των Mcm 2-7 πάνω στις αντιγραφικές εστίες μπορεί ίσως να σχετίζεται με ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των αντιγραφικών εστιών που είναι το γεγονός ότι αυτές εντοπίζονται διάχυτα πάνω στο DNA υπό την έννοια ότι δεν οριοθετούνται επακριβώς από μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA.

Εάν πάλι το Mcm 2-7 έχει παρόμοια δράση με το αντιγόνο T του ιού SV-40 σε αυτή την περίπτωση η ταυτόχρονη back to back σύνδεση πάνω στο DNA δύο διμερών θα μπορούσε δυνητικά να οριοθετήσει μία αντιγραφική εστία. Είναι πολύ πιθανό ότι η παρουσία 10-40 μορίων Mcm 2-7 σε μία συγκεκριμένη διάταξη διμερών να οριοθετεί μία τέτοια διάχυτη αντιγραφική εστία και η αντιγραφή θα μπορούσε να αρχίσει δυνητικά οπουδήποτε μέσα σε αυτό το εύρος [48,76].

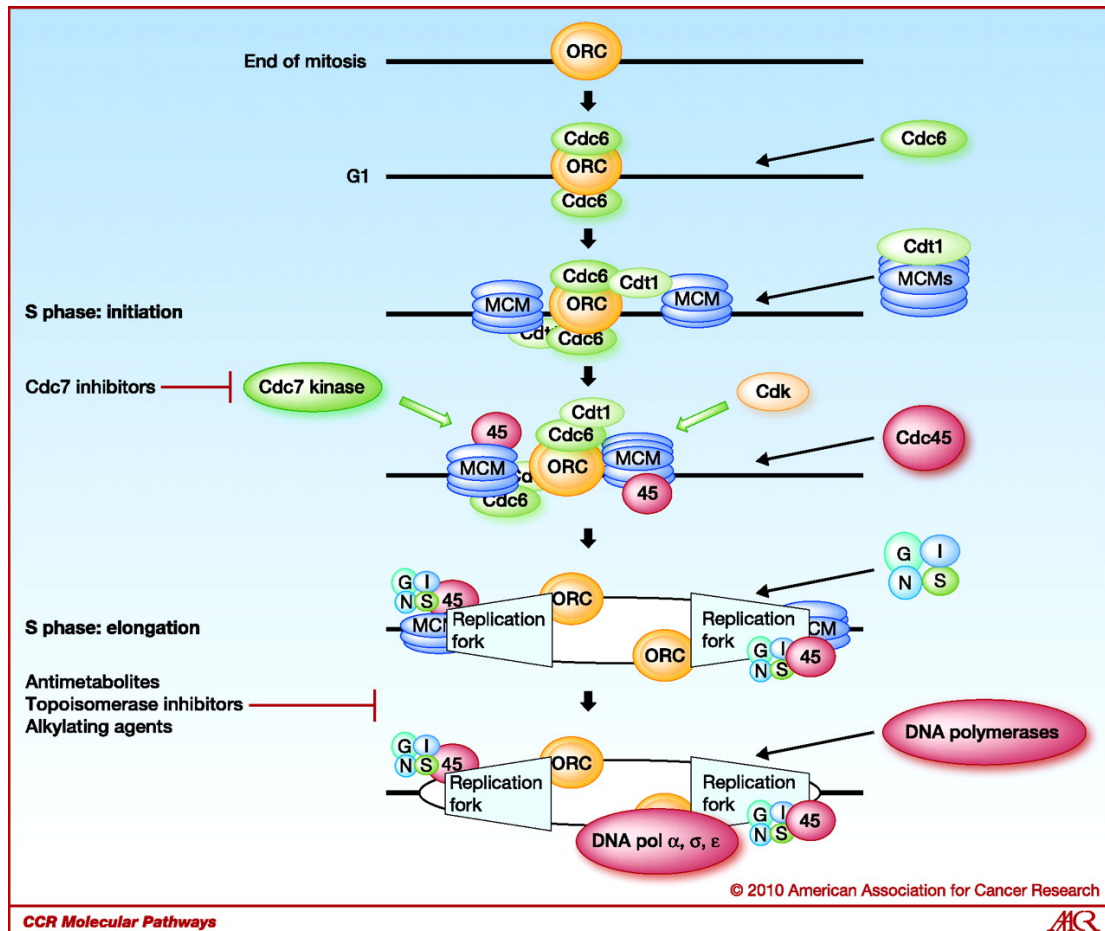
3A2. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΔΕΙΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ Η ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ MCM 2-7

Ο μηχανισμός αδειοδότησης αντιγραφής του DNA και η σύνδεση των Mcm 2-7 στο DNA θα πρέπει να περιλαμβάνει το άνοιγμα των δακτυλίων των συμπλεγμάτων Mcm 2-7, γεγονός που θα τους επέτρεπε να εγκολπώσουν το DNA. Για την σύνδεση των Mcm 2-7 στη χρωματίνη απαιτούνται και άλλα πρωτεϊνικά συστατικά του pre-RC (εικόνα 4). Το πρώτο γεγονός που παρατηρείται είναι η πρόσδεση του συμπλέγματος ORC με τη βοήθεια της πρωτεΐνης νουκλεοπλασμίνης, η οποία αναδιατάσσει τη χρωματίνη. Το ORC με τη σειρά του στρατολογεί δύο άλλες πρωτεΐνες τις Cdc6 και Ctd1, οι οποίες απαιτούνται για την σύνδεση των Mcm 2-7 και την αδειοδότηση της αντιγραφικής εστίας. Αυτή η διαδικασία ανασυστήθηκε με χρωματίνη από *Xenopus* και την χρήση των πρωτεϊνικών συστατικών ORC, Cdc6, Ctd1 και Mcm 2-7 όπως επίσης και της νουκλεοπλασμίνης, η οποία απαιτείται για την πρόσδεση του ORC στο DNA [158,159,160].

Λίγα είναι γνωστά για αυτή την αντίδραση, αλλά τα σχετικά πειράματα υποδεικνύουν ότι τα ORC, Cdc6 και Ctd1 λειτουργούν σαν μία «πένσα», η οποία ανοίγει τον κεντρικό δακτύλιο των Mcm 2-7 και τον τοποθετεί γύρω από το DNA. Εναλλακτικά βέβαια τα ORC, Cdc6 και Ctd1 θα μπορούσαν να διευκολύνουν τη συναρμολόγηση του εξαμερούς συμπλέγματος Mcm 2-7 από τα επιμέρους υπο-συμπλέγματα που έχουν ήδη περιγραφεί. Σύμφωνα με αυτά τα μοντέλα τα ORC, Cdc6 και Ctd1 χρειάζονται μόνο για την αρχική τοποθέτηση του Mcm 2-7 στο DNA, αλλά όχι και για τα επόμενα στάδια της διαδικασίας, όπου αυτό συνεχίζει να είναι συνδεδεμένο με το DNA. Τα ORC και Cdc6 είναι ATPασες καθώς η αδειοδότηση της αντιγραφής του DNA εξαρτάται από την υδρόλυση ATP. Η υδρόλυση ATP θα μπορούσε να παράσχει την ενέργεια που απαιτείται για το σπάσιμο του δακτυλίου των Mcm 2-7 επιτρέποντας το σχηματισμό του εκ νέου γύρω από το DNA. Η Ctd1 θα μπορούσε να προσδένεται απευθείας στα συστατικά του εξαμερούς Mcm 2-7, συνεπώς ο ρόλος της θα μπορούσε να είναι η απευθείας στρατολόγηση του Mcm 2-7 στο DNA. Από την άλλη μεριά η Cdc6 θα πρέπει να είναι

προσδεδεμένη ήδη στο DNA προτού η Ctd1 στρατολογηθεί στην ενεργή της μορφή, γεγονός που είναι συμβατό με το ρόλο αυτής της πρωτεΐνης, όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Η πρωτεΐνη Geminin είναι ένας βασικός καταστολέας του συστήματος αδειοδότησης αντιγραφής του DNA στα μετάζωα, ο οποίος δεσμεύει με μεγάλη συνάφεια τη Ctd1 και πιθανά την εμποδίζει από το να συνδεθεί με το σύμπλεγμα Mcm 2-7. Καθώς τα ORC και Mcm 2-7 είναι ασύμμετρα συμπλέγματα είναι πιθανό ότι η κατεύθυνση πρόσδεσης του ORC στο DNA καθορίζει την κατεύθυνση με την οποία το Mcm 2-7 συνδέεται στο DNA. Εάν όπως αναλύθηκε ανωτέρω η έναρξη της αντιγραφής απαιτεί δύο συμπλέγματα τοποθετημένα back to back αυτό θα μπορούσε να καθιστά αναγκαία την πρόσδεση δύο συμπλεγμάτων ORC-Cdc6-Ctd1 σε διαφορετικές κατευθύνσεις πάνω στο DNA. Εναλλακτικά, το σύμπλεγμα Mcm 2-7 θα μπορούσε να συνδέεται σε μία κατάσταση προσχηματισμένου διπλού εξαμερούς.

Τα συστατικά του pre-RC ενδεχομένως να έχουν και άλλες λειτουργίες εκτός της αδειοδότησης αντιγραφής του DNA. Αρκετές αναφορές επιπλέον υπο-δηλώνουν ότι το Cdc6 συμμετέχει στην ενεργοποίηση των μονοπατιών των σημείων ελέγχου (checkpoint) της φάσης S ή της μετάβασης από τη φάση G2 στη μίτωση [126].



Εικόνα 4. Αναδιπλασιασμός DNA, συμμετέχοντα μόρια [160].

3Α3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΔΕΙΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ DNA

Για να αποτραπεί η πιθανότητα «επαναδειοδότησης» αντιγραφής των μόλις αντεγραμμένων εστιών κατά τη διάρκεια της φάσης S, η αδειοδότησή τους καταστέλλεται πριν την είσοδό στη φάση S. Επειδή τα ORC, Cdc6 και Cdt1 απαιτούνται για την σύνδεση του συμπλέγματος Mcm 2-7 στο DNA αλλά όχι και για την παραμονή του εκεί, η καταστολή της δραστηριότητάς τους στο τέλος της G1 αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο παρεμπόδισης της επαναδειοδότησης αντιγραφής του ήδη αντεγραμμένου DNA.

ι. Η ρύθμιση της αδειοδότησης αντιγραφής του DNA στο σακχαρομύκητα.

Πρώιμες πειραματικές εργασίες στο σχίζοσακχαρομύκητα ανέδειξαν ότι η συνεχιζόμενη δραστηριότητα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών κατά τη

διάρκεια των φάσεων S και G2 είναι απαραίτητη για να εμποδίζεται η αντιγραφή του ήδη αντεγραμμένου DNA. Η καταστολή είτε της CDK1 είτε της μιτωτικής κυκλίνης Cdc13 κατά τη φάση G2 επιτρέπει την επανα-αντιγραφή του ήδη αντεγραμμένου DNA σε ένα και μόνο κυτταρικό κύκλο. Αυτό υποδηλώνει ότι τα συμπλέγματα Mcm 2-7 συνδέονται στο DNA κατά τη φάση G2, όταν η δραστηριότητα των CDK έχει κατασταλεί. Παρόμοια πειράματα στο σακχαρομύκητα δείχνουν ότι η συναρμολόγηση του pre-RC και κατά συνέπεια και η αδειοδότηση της αντιγραφής παρεμποδίζεται από τη δραστηριότητα των CDK. Αυτό υποδηλώνει ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο τα χαμηλά επίπεδα CDK κατά τα πρώιμα στάδια του κυτταρικού κύκλου (όψιμη μίτωση και πρόιμη G1) επιτρέπει την αδειοδότηση της αντιγραφής του DNA, ενώ η αύξηση της δραστηριότητας των CDK προς το τέλος της φάσης G1 υιοθετεί το διπλό ρόλο του να παρεμποδίζει την αδειοδότηση της αντιγραφής αλλά και να προάγει την έναρξη της αντιγραφής.

Στο σακχαρομύκητα οι CDKs φαίνεται να έχουν πολλαπλές και επικαλυπτόμενες επιδράσεις στο να παρεμποδίζουν την επανααδειοδότηση της αντιγραφής του ήδη αντεγραμμένου DNA και στο να προσανατολίζουν τα συστατικά του συστήματος αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA. Ένα από τα πιο αυστηρά ρυθμιζόμενα υποστρώματα των CDKs είναι το Cdc6 (το ομόλογό του στο σακχαρομύκητα είναι το Cdc18), το οποίο οδηγείται προς πρωτεόλυση μετά τη φωσφορυλίωσή του από τη δραστηριότητα των CDKs κατά τη μετάβαση από την φάση S στη φάση G1. Ακόμη τα επίπεδα Cdc6/Cdc18 ρυθμίζονται και μεταγραφικά με τα μεγαλύτερα επίπεδά τους να παρατηρούνται στην όψιμη μίτωση και στη φάση G1. Επιπρόσθετα, η ικανότητα του ORC να επάγει επανα-αντιγραφή καταστέλλεται άμεσα από την CDK εξαρτώμενη φωσφορυλίωση. Τόσο στο σακχαρομύκητα όσο και στο σχιζοσακχαρομύκητα οι CDKs στρατολογούνται άμεσα στο προσδεδεμένο στο DNA ORC και αυτό βοηθά στο να διατηρηθεί το ORC ανενεργό κατά τη διάρκεια των φάσεων G2 και S. Οι CDKs δεσμεύονται απευθείας στο Cdc6 γεγονός το οποίο θα μπορούσε να συνεισφέρει στο να αποτραπεί η επανα-αντιγραφή του DNA [157,158].

Στο σχιζοσακχαρομύκητα τα επίπεδα Ctd1 κορυφώνονται κατά την όψιμη μίτωση και την πρώιμη G1 και μπορεί η μεταγραφή και η πρωτεόλυσή τους να ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα των CDKs κατά τρόπο ανάλογο αυτού που ισχύει για τη Cdc6/Cdc18. Αυτό ενδεχομένως να είναι πολύ σημαντικό για τη καταστολή της επαναναντιγραφής του DNA, εφόσον η υπερέκφραση της Ctd1 ενισχύει την επανα-αντιγραφή του DNA όπως αυτή επάγεται από την υπερέκφραση των Cdc6/Cdc18. Στον σακχαρομύκητα οι CDKs προάγουν την έξοδο από τον πυρήνα των Ctd1 και Mcm 2-7 κατά τη διάρκεια των φάσεων S, G1 και στα πρώιμα στάδια της μίτωσης. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η πρόσβαση αυτών των πρωτεϊνών στο χρωμοσωμικό DNA. Πειράματα στο σακχαρομύκητα δείχνουν ότι για να πραγματοποιηθεί εκτενής επανα-αντιγραφή όλα τα εξαρτώμενα από τις CDKs ρυθμιστικά σημεία πρέπει να απενεργοποιηθούν. Μερική επανα-αντιγραφή πραγματοποιείται όταν μεταλλάξεις στα γονίδια *orc2* και *orc6* συνδυάζονται με μη πρωτεόλυση της Cdc6 και παρουσία στον πυρήνα Mcm 2-7 και Ctd1. Τέτοια πειράματα στο σακχαρομύκητα δείχνουν ότι άμεση καταστολή των συστατικών του συστήματος αδειοδότησης αντιγραφής του DNA από τη δραστηριότητα των CDKs εμποδίζουν την εκ νέου αντιγραφή του ήδη αντεγραμμένου DNA [159].

ii) Η ρύθμιση της αδειοδότησης αντιγραφής του DNA στα μετάζωα

Οι CDKs ρυθμίζουν επίσης το σύστημα αδειοδότησης αντιγραφής του DNA στα μετάζωα. Για παράδειγμα οι αυξομειώσεις στα επίπεδα της κυκλίνης E απαιτούνται για την προαγωγή των κύκλων διπλασιασμού του DNA στη μύγα Δροσόφιλλα. Εντούτοις, ο ρόλος των CDKs στην παρεμπόδιση του συστήματος αδειοδότησης αντιγραφής του DNA στα μετάζωα είναι λιγότερο άμεσος από ότι στους μύκητες, ενώ είναι πιθανό τα επίπεδα των CDKs μόνο έμμεσα να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του συστήματος αδειοδότησης. Το ORC στα σωματικά κύτταρα των μεταζώων είναι ένα πρωτεϊνικό θα λέγαμε σύμπλεγμα. Η υπο-μονάδα Orc 1 είναι χαλαρά συνδεδεμένη με την υπο-μονάδα που αποτελείται από τις Orc 2, 3, 4, 5, ενώ πρωτεολύεται στη φάση S μέσα από μία εξαρτώμενη από το SCF αντίδραση πολυ-ουμπικουϊτίνης η οποία

φαίνεται να εξαρτάται από τη δραστηριότητα των CDKs. Εναλλακτικά, σε κάποιες κυτταρικές σειρές το Orc 1 φαίνεται να είναι σταθερό στη φάση S, αλλά καθώς η φάση αυτή προχωρεί, το Orc 1 φωσφορυλιώνεται. Έχει προταθεί ότι αυτή η κυκλική ρύθμιση του Orc 1 συνεισφέρει στη ρύθμιση του συστήματος αδειοδότησης αντιγραφής του DNA, αλλά αυτό δεν έχει αποδειχτεί ακόμη πειραματικά. Αντίθετα με το ότι συμβαίνει στους μύκητες το Cdc6 φαίνεται ότι είναι προσδεδεμένο στη χρωματίνη τον περισσότερο χρόνο κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ακόμη και κατά τη φάση G2. Η περίσσεια Cdc6 οδηγείται εκτός πυρήνα κατά τη φάση S, ως συνέπεια της δραστηριότητας των CDKs, αλλά δεν υπάρχουν συγκεκριμένα στοιχεία τα οποία να δείχνουν ότι αυτό παίζει ρόλο στην παρεμπόδιση της επανα-αντιγραφής του DNA. Μόνο κατά τη μίτωση υπάρχουν σαφείς ενδείξεις στα μετázωα για τον άμεσο τρόπο με τον οποίο τα υψηλά επίπεδα των CDKs παρεμποδίζουν το σύστημα αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA [73,126].

Αντιθέτως, ο κύριος τρόπος με τον οποίο στα μετázωα παρεμποδίζεται η επανα-αδειοδότηση αντιγραφής του DNA κατά τη διάρκεια των φάσεων S και G2 είναι μέσω της καταστολής της δραστηριότητας της Ctd1. Αυτό συμβαίνει τόσο με την πρωτεόλυση της ίδιας της Ctd1, όσο και με την ενεργοποίηση ενός καταστολέα της Ctd1, ο οποίος ονομάζεται Geminin. Η Ctd1 πρωτεολύεται στο τέλος της G1 και στην πρώιμη φάση S, ως μέρος μίας διαδικασίας που εξαρτάται από τη δραστηριότητα της τάξης SCF των λιγασών ουμπικουΐτινης. Στα ανθρώπινα κύτταρα ένα σύμπλεγμα SCF που περιέχει την πρωτεΐνη Skp2 αλληλεπιδρά με τη Ctd1 κατά ένα τρόπο που εξαρτάται από την προηγούμενη φωσφορυλίωση της Ctd1 από τις κινάσες CDK2 ή CDK4. Τέτοια εξαρτώμενη από την δραστηριότητα των CDKs πρωτεόλυση της Ctd1 παρατηρείται και στο *Xenopus*. Υπάρχουν παρόλα αυτά και μονοπάτια τα οποία λειτουργούν ανεξάρτητα της Skp2 και οδηγούν στην πρωτεόλυση της Ctd1: 1) οι μεταλλαγές Ctd1, οι οποίες δεν μπορούν να φωσφορυλιωθούν από τις CDKs και δεν αλληλεπιδρούν με Skp2, αλλά πρωτεολύονται φυσιολογικά κατά την έκβαση της φάσης S, 2) στον καινοραβδίτη η λιγάση ουμπικουΐτινης CUL-4 καταστέλει τα επίπεδα της Ctd1 προς το τέλος της φάσης G1. Η απαλοιφή της

CUL-4 οδηγεί σε εξαρτώμενη από την Ctd1 επανα-αδειοδότηση και εκ νέου έναρξη της αντιγραφής. Η υπερέκφραση της Ctd1 σε κύτταρα *Xenopus*, *Δροσόφιλας* και ανθρώπου οδηγεί σε εκ νέου διπλασιασμό του DNA, γεγονός που ενισχύεται περαιτέρω από την ταυτόχρονη έκφραση της Cdc6. Στο *Xenopus* εξάλλου, η ταυτόχρονη απαλοιφή της geminin και η σταθεροποίηση της Ctd1 είναι αρκετή για να επιφέρει εκτεταμένη επανα-αδειοδότηση του αναδιπλασιασμού του DNA [73,76].

Η Ctd1 εκτός από το γεγονός ότι πρωτεολύεται κατά τη διάρκεια της φάσης S, σταθεροποιείται κατά τις φάσεις G2 και M με το να προσδένεται στην πρωτεΐνη geminin, η οποία παρεμποδίζει την εξαρτώμενη από ουμπικουϊτίνη πρωτεόλυσή της. Η σταθεροποίηση μέσω geminin έχει σαν αποτέλεσμα τα επίπεδα της Ctd1 να αυξάνονται σε αυτή την ανενεργή κατάσταση και να μπορεί να φτάσει σε μία κρίσιμη ποσότητα, η οποία ενεργοποιείται κατά τα τελευταία στάδια της μίτωσης. Εφόσον μόνο η Ctd1, η οποία δεσμεύεται από τη geminin, είναι πραγματικά προστατευμένη από το να υποστεί πρωτεόλυση, τα επίπεδα της Ctd1 δεν υπερβαίνουν εκείνα της geminin.

Η geminin παρεμποδίζει τη δράση της Ctd1 με το να προσδένεται σε αυτή ενώ αποτελεί ουσιαστικά τον κυριότερο καταστολέα αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA κατά τις φάσεις S και G2.

Η δραστηριότητα της geminin καταστέλλεται όψιμα κατά τη μίτωση είτε μέσω πρωτεόλυσης είτε μέσω μετα-μεταφραστικής απενεργοποίησης η οποία διαμεσολαβείται από την CDK- εξαρτώμενη ουμπικουϊτίνωση. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη ενεργοποίηση του συστήματος αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA καθώς τα κύτταρα εξέρχονται της μετάφασης. Προς το τέλος της φάσης G1 η geminin σταθεροποιείται και έτσι παρεμποδίζεται η περαιτέρω αντιγραφή του DNA. Η σημασία της geminin στο να παρεμποδίζει τον αναδιπλασιασμό του DNA καταδεικνύεται και από την παρατήρηση ότι η απαλοιφή της geminin σε ανθρώπινες κυτταροκαλλιέργειες ή καλλιέργειες *Δροσόφιλα* οδηγεί σε εκτεταμένο αναδιπλασιασμό του DNA. Η geminin αναφέρεται ότι ρυθμίζει μεταγραφικούς παράγοντες και έτσι όταν αυτή απο-

ρυθμίζεται επηρεάζεται και η μεταγραφή, γεγονός που ενδεχομένως συνεισφέρει στον αναδιπλασιασμό του DNA. Το γεγονός όμως ότι η υπερέκφραση της Ctd1 είναι αυτή που μπορεί να ενεργοποιήσει τον αναδιπλασιασμό υποδηλώνει ότι η Ctd1 είναι ο αμεσότερος στόχος για την παρεμπόδιση του αναδιπλασιασμού του DNA. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να υποδηλώνουν τελικά ότι στα μετázω το κυριότερο χαρακτηριστικό το οποίο παρεμποδίζει την επανα-αδειοδότηση της αντιγραφής του ήδη διπλασιασμένου DNA είναι η απουσία δραστηριότητας της Ctd1, η οποία συμβαίνει ανεξάρτητα οποιασδήποτε πιθανής και εξαρτώμενης από τις CDK κατασταλτικής φωσφορυλίωσης των ORC, Cdc6 και Mcm 2-7 [106].

Δομικές μελέτες μας έχουν πρόσφατα διαφωτίσει σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο η geminin θα μπορούσε να παρεμποδίζει τη λειτουργικότητα της Ctd1. Η geminin δημιουργεί ένα επιμηκυμένο διμερές δια μέσου αλληλεπιδράσεων μίας περιοχής που ονομάζεται «ελικωμένη έλικα». Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει ότι ένα μόριο Ctd1 αλληλεπιδρά ασύμμετρα με ένα διμερές της geminin, μια αλληλεπίδραση που αφορά υψηλά συντηρημένα αμινοξέα στην έλικα H1 και επιφανειακά κατάλοιπα στην «ελικωμένη έλικα» και των δύο υπομονάδων της geminin. Μία δεύτερη «θηλιά» χωρίς ιδιαίτερη δευτεροταγή δομή, η οποία βρίσκεται αμινοτελικά της «ελικωμένης έλικας» της geminin δημιουργεί μία δεύτερη επαφή με τη Ctd1, η οποία αποδεικνύεται ουσιαστική για την παρεμπόδιση της αντιγραφής του DNA. Μία λειτουργική και δομική μελέτη που εκπονήθηκε με την πλήρους μεγέθους Ctd1 δείχνει ότι τα αμινοτελικά 160 αμινοξέα αυτής της πρωτεΐνης, τα οποία δεν είναι παρόντα στην συνκρυσταλλωμένη δομή με τη geminin, επίσης αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό τμήμα της geminin. Μία μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνει ότι τα διμερή της geminin μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να σχηματίζουν τετραμερή. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση geminin-Ctd1 μπορεί να παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση Ctd1-Mcm2-7 με αποτέλεσμα τελικά να εμποδίζεται στερεοχημικά η σύνδεση του συμπλέγματος Mcm2-7 στη χρωματίνη. [106,107]

3Α4. ΤΑ ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ Ο ΑΝΑΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

Όταν το σύστημα αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA απορυθμίζεται τεχνητά επιτρέποντας στα κύτταρα να αδειοδοτήσουν εκ νέου το DNA τους, παρατηρείται αντικανονικός επαναδιπλασιασμός του. Αυτό και μόνο δείχνει ότι η αδειοδότηση της αντιγραφής, είναι το κύριο σύστημα το οποίο αποτρέπει τον αναδιπλασιασμό του DNA σε ένα και μόνο κυτταρικό κύκλο. Εντούτοις, εάν ο αναδιπλασιασμός λάβει τελικά χώρα ενεργοποιείται ένας μεγάλος αριθμός από βιοχημικά μονοπάτια. Οι κινάσες που λειτουργούν στα πλαίσια των λεγόμενων σημείων ελέγχου (οι άπω ATR και ATM, και οι δευτερογενείς Chk1 και Chk2) τυπικώς ενεργοποιούνται όταν το DNA έχει υποστεί βλάβη ή αν παρουσιαστούν προβλήματα κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Παρόλο που ο μηχανισμός δεν είναι γνωστός, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου ως απόκριση της απορύθμισης του συστήματος αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA είναι η συνέπεια ορισμένων δομικών προβλημάτων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του αναδιπλασιασμού (όπως η περίπτωση μίας αντιγραφικής φουρκέτας που κινείται αμέσως μετά από μία άλλη αντιγραφική φουρκέτα), και όχι της ανα-αδειοδότησης της αντιγραφής.

Η υπερέκφραση της Ctd1, ή η απάλειψη της geminin (η οποία επάγει τον ανα-διπλασιασμό) ενεργοποιούν τα εξαρτώμενα από τους παράγοντες ATR/ATM, και Chk1/Chk2 σημεία ελέγχου τα οποία οδηγούν τον κυτταρικό κύκλο σε παύση και πιθανά και το κύτταρο σε απόπτωση. Στα κύτταρα στα οποία υπερεκφράζονται οι Ctd1 και Cdc6 χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη p53 ως ο κύριος διαμεσολαβητής μετά τις κινάσες ATR/ATM, ενώ στα κύτταρα στα οποία έχει απαλειφθεί η geminin χρησιμοποιείται ως κύριος διαμεσολαβητής η δευτερογενής κινάση Chk1. Ο λόγος για αυτή τη διαφορετική χρήση διαμεσολαβητών δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά μπορεί να υποδηλώνει ότι οι Cdc6 και η geminin μπορεί να καθορίζουν το πώς οι κινάσες των σημείων ελέγχου κατευθύνονται προς τα υποστρώματά τους. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση η Cdc6 αναφέρεται ότι συμμετέχει στην ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου ανεξάρτητα από το ρόλο που έχει κατά την αδειοδότηση

αντιγραφής του DNA. Η ενεργοποίηση της p53 φυσικά οδηγεί σε απόπτωση παράλληλα με την παύση του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα επίσης αποπνικνουν- ανεξάρτητα από την p53- στην περίπτωση εκείνη όπου συμβαίνει μία εξαρτώμενη από την Chk1 παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2, όπως εκείνη που ακολουθεί όταν υπερκερασθούν οι συνέπειες της απάλειψης της geminin. Έτσι στα μεταξύ τους λειτουργούν ταυτόχρονα δύο ανεξάρτητα μονοπάτια, τα οποία λειτουργούν σαν ασπίδα έναντι των ασύμφορων συνεπειών του αναδιπλασιασμού: δηλαδή επαγωγή παύσης του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση [48,65,68].

Επιπρόσθετα της πρωτεόλυσής της κατά τη διάρκεια της φάσης S, η Ctd1 πρωτεολύεται σε απόκριση στη βλάβη του DNA από κυτταροτοξικούς παράγοντες. Η ακτινοβόληση ανθρώπινων κυττάρων και κυττάρων Δροσόφιλα σε καλλιέργεια με ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί στην πλήρη καταστροφή της Ctd1. Αυτή η καταστροφή συμβαίνει στα κύτταρα κατά τη φάση G1 και εξαρτάται από τη λιγάση ουμπικουΐτινης CUL4, αλλά όχι και στα σημεία ελέγχου που εξαρτάται από τις κινάσες ATR/ATM. Σε ανθρώπινα κύτταρα ακτινοβολημένα με UV επίσης υπεισέρχεται η πρωτεόλυση της Ctd1. Σε αντίθεση με τα ευρήματα τα σχετιζόμενα με την ιονίζουσα ακτινοβολία η ευαισθησία της επαγόμενης από την UV πρωτεόλυσης της Ctd1 στα σημεία ελέγχου υποδηλώνει πως εμπλέκεται στη διαδικασία αυτή η κινάση ATR. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η καταστολή του συστήματος αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA είναι ένας πρόσθετος δρόμος με τον οποίο τα κύτταρα μπορούν να αποτρέψουν την επανα-αντιγραφή του DNA τους κατόπιν βλάβης του γενετικού υλικού [21,44,46].

3Α5. ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΙΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ.

Όταν τα κύτταρα αποσύρονται από τον κυτταρικό κύκλο είτε περιστασιακά με το να μπαίνουν στη φάση ηρεμίας (Go) είτε μόνιμα ως συνέπεια μίας τελικής διαφοροποίησης ή γήρανσης, οι Ctd, Cdc6 και Mcm 2-7 καταστέλλονται και πρωτεολύονται αφήνοντας μόνο το ORC στις αντιγραφικές

εστίες. Με μία πρώτη ματιά φαίνεται μάλλον απίστευτο ότι το μη αντιγραμμένο DNA παραμένει χωρίς αδειοδότηση αντιγραφής κατά την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο. Μία πιθανότητα είναι ότι αυτό οφείλεται σε ένα φράγμα που αποτρέπει τα μη διαιρούμενα κύτταρα από το να επανέλθουν στον κυτταρικό κύκλο. Πράγματι μία πρώιμη αλλαγή που παρατηρείται σε προκαρκινικές αλλοιώσεις είναι η παρουσία των Mcm 2-7 σε κύτταρα τα οποία κανονικά δεν τις εκφράζουν. Καθώς η απώλεια της άδειας αντιγραφής του DNA αντιπροσωπεύει μία δραματική αλλαγή στο αναπαραγωγικό δυναμικό του κυττάρου καθώς αυτό μεταβαίνει από τη φάση G1 στη G0, αποτελεί και έναν ελκυστικό λειτουργικό ορισμό εξόδου από το αναπαραγωγικό στάδιο[44,46].

Η μεταγραφή των CTD1, CDC6 και Mcm 2-7 φαίνεται να αποκρίνεται στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων E2F, οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την έξοδο του κυττάρου από τη φάση G0. Η εξαρτώμενη από τον παράγοντα E2F μεταγραφή υπό κανονικές συνθήκες καταστέλλεται από την πρωτεΐνη Rb, η οποία στη συνέχεια καταστέλλεται κατά ένα τρόπο εξαρτώμενο από την CDK φωσφορύλιωση (περισσότερο από το σύμπλεγμα cyclin E-Cdk2 και από το cyclin D-Cdk4/6). Έμβρυα στα οποία έχει απαλειφθεί η κυκλίνη E χαρακτηρίζονται από φυσιολογικό πολλαπλασιασμό και αναπτυξιακό δυναμικό. Εντούτοις, στα έμβρυα αυτά αποτυγχάνει η δημιουργία των γιγάντιων τροφοβλαστικών κυττάρων καθώς και μεγα-καρυοκυττάρων: και οι δύο αυτοί κυτταρικοί τύποι χρειάζονται ενδοδιπλασιασμό του DNA έτσι ώστε να επιτευχθεί η πολυπλοειδία (>2N). Οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικών στους οποίους έχει απαλειφθεί η κυκλίνη E δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν ξανά τη φάση S εφόσον έχουν οδηγηθεί σε G0 μετά από ένδεια ορού ή από παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού τους λόγω της μεταξύ τους κυτταρικής επαφής. Συγκεκριμένα αυτοί οι εν ηρεμία ινοβλάστες από τους οποίους έχει απαλειφθεί το γονίδιο της κυκλίνης E αδυνατούν να συνδέσουν το σύμπλεγμα Mcm 2-7 με τη χρωματίνη, παρά το γεγονός ότι τα συμπλέγματα ORC και Cdc6 συνδέονται κανονικά. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ενώ η κυκλίνη E δεν είναι απαραίτητη για την αδειοδότηση της αντιγραφής του DNA κατά τη φυσιολογική πορεία του

κυτταρικού κύκλου, ο ρόλος της είναι πραγματικά ουσιαστικός σε άλλες περιπτώσεις – είτε στον ενδοδιπλασιασμό είτε κατά την επαναφορά του κυττάρου μετά τη φάση G0. Πειράματα στη Δροσόφιλα είναι απολύτως συμβατά με αυτή την υπόθεση δείχνοντας ότι η κυκλίνη E απαιτείται για την σύνδεση των Mcm 2-7 στη χρωματίνη κατά τους κύκλους ενδοδιπλασιασμού. Η εικόνα αυτή εντούτοις γίνεται πολύπλοκότερη με την παρατήρηση ότι έμβρυα ποντικών στα οποία έχει απαλειφθεί η Cdk2 - η οποία είναι η μόνη γνωστή και αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της κυκλίνης E - είναι βιώσιμα και ικανά να δημιουργήσουν εμβρυϊκούς ινοβλάστες, οι οποίοι οδηγούνται σε φάση G0 φυσιολογικά μετά από ένδεια ορού. Παρόλο που ο ρόλος των CDK στην ενεργοποίηση του συστήματος αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA είναι μάλλον ασαφής, εντούτοις είναι πιθανό ότι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής προόδου του κυτταρικού κύκλου κάποιες CDKs συμπεριλαμβανόμενου και του συμπλέγματος κυκλίνης B-CDK1 παίζουν επικαλυπτόμενους ρόλους στην ενεργοποίηση του συστήματος αδειοδότησης αντιγραφής του DNA. Επί της εξόδου από τη φάση G0 λιγότερες CDKs είναι διαθέσιμες και ενώ το σύμπλεγμα κυκλίνης A-CDK1 θα μπορούσε να υποκαταστήσει το σύμπλεγμα κυκλίνης E- CDK2 στα κύτταρα στα οποία έχει απαλειφθεί η CDK2 εντούτοις, δεν μπορεί να κάνει το ίδιο σε κύτταρα στα οποία έχει απαλειφθεί η κυκλίνη E[138].

Ποιός είναι ο ουσιαστικός ρόλος της κυκλίνης E στο σύστημα αδειοδότησης αντιγραφής του DNA κατά την έξοδο του κυττάρου από τη G0; Μία πιθανότητα είναι ότι η κυκλίνη E απαιτείται για τη σύνθεση της Ctd1 (εφόσον τα επίπεδα ORC και Cdc6 είναι φυσιολογικά σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες στους οποίους έχει απαλειφθεί η κυκλίνη E). Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι η κυκλίνη E απαιτείται είτε άμεσα είτε έμμεσα για την ενεργοποίηση ενός από τα συστατικά του pre-RC όταν τα κύτταρα εξέρχονται από τη φάση G0. Ένα *in vitro* σύστημα το οποίο προκαλεί αντιγραφή σε κυτταρικούς πυρήνες, οι οποίοι έχουν οδηγηθεί σε έξοδο προς τη φάση G0 υποδεικνύει ότι απαιτείται λειτουργία της κυκλίνης E για την σύνδεση των πρωτεϊνών Mcm 2-7 στη χρωματίνη. Το στάδιο εκείνο το οποίο μπορεί να εξαρτάται από τη

δραστηριότητα των CDKs είναι η απενεργοποίηση της geminin. Στην έξοδο από τη μετάφαση σε εκχυλίσματα από αυγά *Xenopus* η geminin απενεργοποιείται ως συνέπεια μίας εξαρτώμενης από τις CDKs ουμπικουιτίνωσης. Μία ανάλογη αντίδραση που απαιτεί την κυκλίνη E για την απενεργοποίηση της geminin μπορεί να υποτεθεί και στην περίπτωση εξόδου από τη G0. Εντούτοις, η έκφραση της geminin είναι πολύ χαμηλή σε κύτταρα «εν ηρεμία» και μία τέτοια περίπτωση θα απαιτούσε τα επίπεδα της geminin να αυξηθούν πριν από το τέλος της διαδικασίας της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, όταν τα κύτταρα επανεισάγονται στον κυτταρικό κύκλο. Το σημείο αυτό δεν έχει προς το παρόν διερευνηθεί επαρκώς [54,158].

Καθώς η αδειοδότηση της αντιγραφής του DNA θα πρέπει να έχει ολοκληρωθεί πριν τα κύτταρα περάσουν στη φάση S, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα κύτταρα διαθέτουν ένα σημείο ελέγχου το οποίο παρεμποδίζει την είσοδο στη φάση S μέχρι την ολοκλήρωση της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA. Προς υποστήριξη της ιδέας αυτής πρωτογενή κύτταρα τα οποία εκφράζουν μία συστατικά ενεργή geminin είναι παγιδευμένα σε ένα στάδιο που μοιάζει πολύ με την φάση G1 έχοντας την πρωτεΐνη Rb σε υποφωσφορυλιωμένη μορφή, ενώ δεν δείχνουν σημεία ενεργειών έναρξης της αντιγραφής του DNA. Αντιθέτως μία πληθώρα καρκινικών κυτταρικών σειρών προχωρούν προς μία ανεπιτυχή φάση S και τελικώς αποπίπτουν. Η φύση αυτού του σημείου ελέγχου στα πρωτογενή κύτταρα δεν είναι προς το παρόν κατανοητή αλλά μπορεί θεωρητικά να μας παρέχει μία χρήσιμη οδό σύμφωνα με την οποία να μπορούμε να οδηγήσουμε ειδικά τα καρκινικά κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο [54,108,158].

Τα τελευταία χρόνια έχουν διερευνηθεί οι βασικοί μηχανισμοί που επιτρέπουν την αντιγραφή του DNA μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο. Παρόλο που η ρύθμιση φαίνεται να διαφέρει μεταξύ μυκήτων και μεταζώων και στις δύο ομάδες επικεντρώνεται κυρίως στον περιορισμό της επανα-πρόσδεσης του συμπλέγματος Mcm2-7 στο ήδη αντεγραμμένο DNA, επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του ως «παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής». Στους μύκητες, η εκ νέου αδειοδότηση αντιγραφής του ήδη αντεγραμμένου DNA

παρεμποδίζεται από την υψηλή δραστηριότητα των CDKs, η οποία καταστέλλει διαφορετικά τα επιμέρους συστατικά του pre-RC, όψιμα κατά τον κυτταρικό κύκλο. Αντίθετα, στα μετόξια η επανα-αδειοδότηση της αντιγραφής εμποδίζεται με την καταστολή της δραστηριότητας του Ctd1, η οποία μπορεί να οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στην ύπαρξη της geminin. Εφόσον έχει προαχθεί η κατανόηση αυτών των τόσο βασικών αρχών και μηχανισμών, οι συνθήκες τώρα είναι ώριμες για να διερευνηθεί ένας αριθμός επιπλέον ερωτημάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η κατανόηση των βιοχημικών γεγονότων που συμβαίνουν όταν το σύμπλεγμα Mcm 2-7 συνδέεται με το DNA. Άραγε τα Mcm 2-7 συνδέονται ως εξαμερή ή ως διπλά εξαμερή; Υπάρχουν στοιχεία στην αλληλουχία του DNA τα οποία κατευθύνουν το ORC σε συγκεκριμένες θέσεις στα χρωμοσώματα; Ποία η σχέση μεταξύ των περιοχών στις οποίες δεσμεύεται το ORC, εκείνων στις οποίες δεσμεύεται το σύμπλεγμα Mcm 2-7 και εκείνων στις οποίες πραγματικά συμβαίνει η απαρχή της αντιγραφικής φουρκέτας; Οι απαντήσεις στις ερωτήσεις αυτές θα μπορέσουν να ρίξουν φως στο παράδοξο των Mcm 2-7: γιατί υπάρχει αυτή η περίσσεια Mcm 2-7 στα σημεία έναρξης της αντιγραφής; Είναι επίσης εξαιρετικής σπουδαιότητας το να κατανοήσουμε πως ρυθμίζεται το σύστημα αδειοδότησης της αντιγραφής σε συνθήκες που άγουν τα κύτταρα εντός ή εκτός κυτταρικού κύκλου. Ποιούς ρόλους παίζουν οι CDKs στην επανενεργοποίηση του συστήματος αδειοδότησης της αντιγραφής όταν τα κύτταρα εισάγονται στον κυτταρικό κύκλο; Υπάρχουν άραγε σημεία ελέγχου ή έστω «ανα-τροφοδοτικοί» μηχανισμοί οι οποίοι να ελέγχουν την επιτυχία αυτής της διαδικασίας; Είναι άραγε το σύστημα μη αδειοδοτημένων σημείων έναρξης της αντιγραφής αναγκαίο για την καταστολή της παράνομης επανεκκίνησης του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα εν ηρεμία; Μήπως τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν λάθη στα μονοπάτια των σημείων ελέγχου και των ανατροφοδοτικών μηχανισμών της αδειοδότησης της αντιγραφής και άραγε τα λάθη αυτά οδηγούν σε γενωμική αστάθεια; Η απάντηση τόσο αυτών όσο και άλλων ερωτημάτων θα μας βοηθήσει να ολοκληρώσουμε τις γνώσεις μας ως προς τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με τα βιοφυσικά γεγονότα τα

οποία λαμβάνουν χώρα κατά την αντιγραφή του DNA και κατά τη γενωμική αστάθεια «εν τω γενέσθαι», η οποία χαρακτηρίζει μία πληθώρα καρκίνων [16].

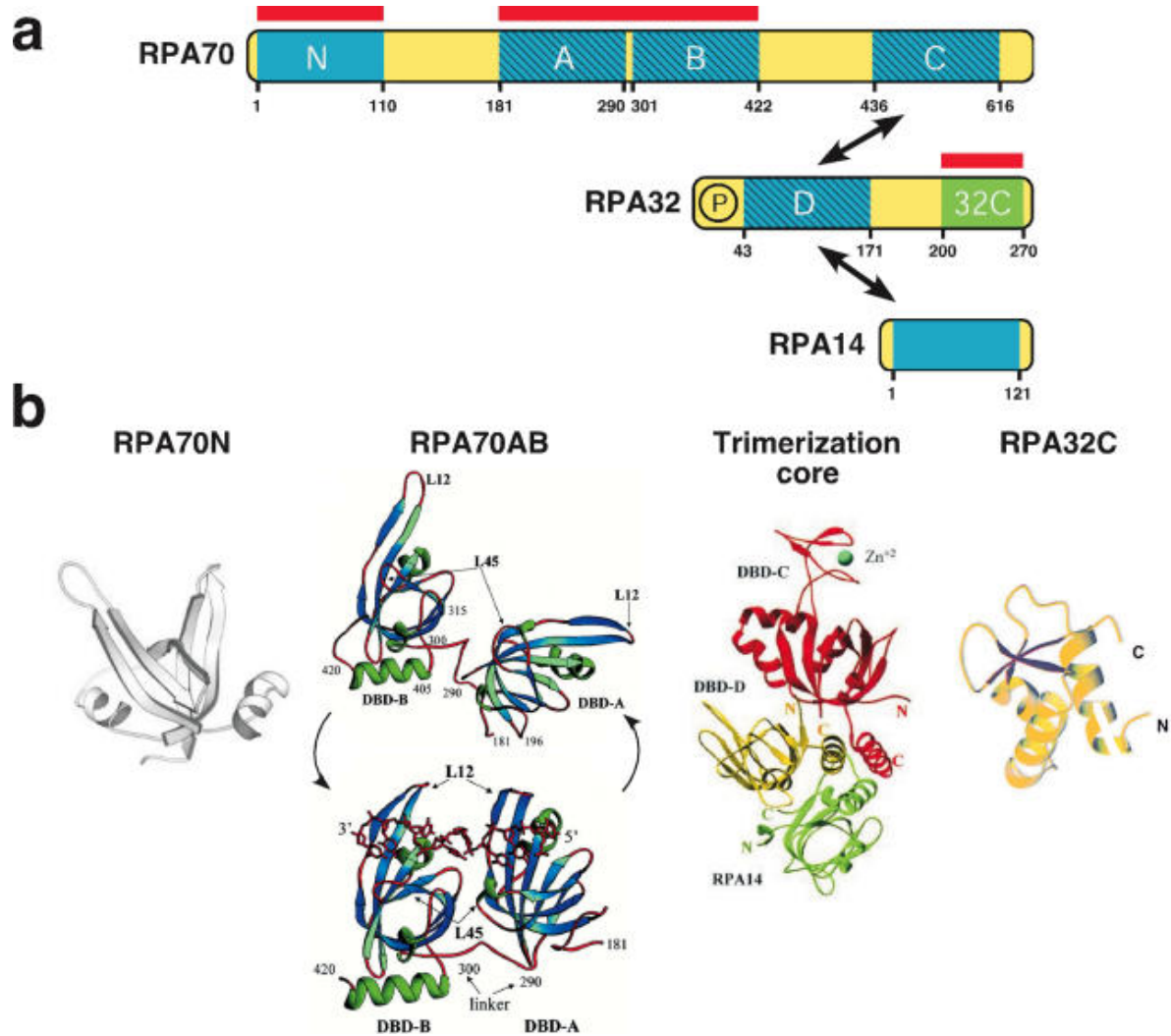
4. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ RPA

4Α. ΔΟΜΗ RPA ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΤΟ DNA

In vitro και *in vivo* πειράματα έχουν καταδείξει ότι το σύμπλεγμα των συντηρημένων πρωτεϊνών αντιγραφής A (RPA complex) αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες του μεταβολισμού του DNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς διότι συμμετέχει στις τέσσερις ουσιώδεις διεργασίες οι οποίες χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το γενετικό υλικό και συγκεκριμένα:

- A) στην αντιγραφή,
- B) στην επιδιόρθωση,
- Γ) στην διατήρηση των τελομερών των χρωμοσωμάτων και
- Δ) στον ανασυνδυασμό του DNA.

Το μονόκλωνο DNA (ssDNA) αποτελεί μία ενδιάμεση δομή εξαιρετικής ευαισθησίας που δημιουργείται κατά την διάρκεια αυτών των διαδικασιών. Το σύμπλεγμα RPA θεωρείται ότι προστατεύει την ακεραιότητά αυτής της δομής (του μονόκλωνου DNA) από νουκλεολυτικές βλάβες, καθώς επίσης και ότι αποτρέπει τη δημιουργία αντιγραφικών φουρκετών παρεμποδίζοντας την αντικανονική υβριδοποίηση διαφόρων τμημάτων του μονόκλωνου DNA μεταξύ τους (και όχι κανονικά με το συμπληρωματικό τους DNA της απέναντι αλυσίδας) μέχρις ότου να ολοκληρωθεί η εκάστοτε διαδικασία. Πολλές από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το μονόκλωνο DNA αλληλεπιδρούν επίσης φυσικά αλλά και λειτουργικά με μία πληθώρα πρωτεϊνών που με τη σειρά τους συμμετέχουν στις ανωτέρω αναφερθείσες διεργασίες. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις θεωρούνται ότι «ενορχηστρώνουν» και καθοδηγούν αυτή την παρέλαση των διαφόρων πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, οι οποίες και ανταλλάσσουν συνεχώς τις θέσεις τους πάνω στο DNA σύμφωνα με το καθιερωμένο μοντέλο τέτοιων αλληλεπιδράσεων [3].



Εικόνα 5: Δομή RPA [27]

Το RPA σύμπλεγμα δεσμεύεται κατά κύριο λόγο στο μονόκλωνο DNA με κατεύθυνση 5'-3'. Πρόσφατες μελέτες των συντηρημένων πρωτεϊνών RPA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υποδεικνύουν ένα καινούριο μηχανισμό με τον οποίο οι πρωτεΐνες μπορεί να ανταλλάσσουν τις θέσεις τους πάνω στο μονόκλωνο DNA (ssDNA) με το να προσδένονται πρώτα στο RPA διαμεσολαβώντας έτσι στερεοδομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες του οι οποίες με τη σειρά τους αλλάζουν τις ιδιότητες πρόσδεσης του ίδιου του RPA σε μονόκλωνο DNA. Η ικανότητα του RPA να καθοδηγεί το μεταβολισμό του DNA εξαρτάται δε σε μεγάλο μέρος από την ικανότητα του να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω [3,27].

Κατασκευαστικά, το σύμπλεγμα RPA έχει ετεροτριμερή δομή αποτελούμενη από τρεις υπομονάδες και συγκεκριμένα τις εξής:

- τη μεγάλου μεγέθους των 70kDa υπομονάδα Α (**RPA70**)
- τη μέσου μεγέθους των 32kDa υπομονάδα Β (**RPA32**) και
- τη μικρού μεγέθους των 14kDa υπομονάδα Γ (**RPA14**).

Το σύμπλεγμα RPA είναι εξαιρετικά συντηρημένο. Πολλές από τις γνώσεις μας σχετικά με την δομή και δράσεις της RPA προέρχονται από μελέτες στους μύκητες και στα φυτά. Τα ευρήματα αυτά είναι σημαντικά εφόσον η RPA είναι εξαιρετικά συντηρημένη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα βακτήρια υπάρχει μία ανάλογη του RPA λειτουργική δομή που καλείται SSB. Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκαν τρία διαφορετικά είδη συμπλεγμάτων RPA τα Α, Β, C, τα οποία έχουν και διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Κύρια λειτουργική δομή των συμπλεγμάτων αυτών είναι η περιοχή σύνδεσής τους με ολιγοσακχαρίδια- ολιγονουκλεοτίδια που ονομάζεται και «πτυχή OB» (OB-fold, oligosaccharide-oligonucleotide binding fold). Κάθε λειτουργικό σύμπλεγμα RPA έχει συνολικά έξι τέτοιες δομές: η RPA70 έχει 4 πτυχές OB (ονομάζονται Α, Β, C και F), η RPA32 μία πτυχή OB (ονομάζεται D) και η RPA14 άλλη μία πτυχή OB (που ονομάζεται E). Η πτυχή OB-E ουσιαστικά σταθεροποιεί το σύμπλεγμα RPA πάνω στο μονόκλωνο DNA, η πτυχή OB-F συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, ενώ οι λοιπές τέσσερις περιοχές συμμετέχουν διαδοχικά με κατεύθυνση 5' προς 3' πάνω στο μονόκλωνο DNA: οι πτυχές Α,Β τοποθετούνται στο 5' άκρο του DNA ακολουθούμενες από τις πτυχές C και D. Η διάταξη αυτή καλύπτει συνολικό μήκος 30 περίπου νουκλεοτιδίων μονόκλωνου DNA. Η πρόσδεση ιόντων ψευδαργύρου καρβοξυτελικά ως προς τις πτυχώσεις OB της RPA70 είναι πολύ σημαντική διότι προσδίδει δομική σταθερότητα τόσο στο σύμπλεγμα RPA όσο και στην πρόσδεσή του στο μονόκλωνο DNA. Βέβαια, το σύμπλεγμα RPA προσδένεται στο DNA με τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς τρόπους, οι οποίοι εξαρτώνται: α) από το μήκος του μονόκλωνου DNA (το οποίο μπορεί να είναι από 8 έως 10 νουκλεοτίδια, από 12 έως 23 νουκλεοτίδια και από 28 έως 30 νουκλεοτίδια) το οποίο έρχεται τελικά σε επαφή με το σύμπλεγμα RPA και

καλύπτεται από αυτό και β) από τον αριθμό των πτυχών OB που συμμετέχουν σε αυτούς τους τρόπους πρόσδεσης [7,10,52].

Στην περίπτωση εκείνη όπου καλύπτονται από το σύμπλεγμα RPA 30 νουκλεοτίδια το 5' άκρο της θέσης πρόσδεσης καλύπτεται από την RPA70A και το 3' άκρο καλύπτεται από την RPA32D. Είναι φανερό από τα παραπάνω ότι το RPA «ξεδιπλώνεται» πάνω στο μονόκλωνο DNA και δημιουργεί μία σταθερή νουκλεοπρωτεϊνική δομή, η οποία κυριολεκτικά καλύπτει άμεσα 30 νουκλεοτίδια μονόκλωνου DNA αποτρέποντας την πέψη του από τις νουκλεάσες καθώς και την πρωτεόλυση των πρωτεϊνικών του υπομονάδων από επιθέσεις πρωτεασών. Ο αριθμός και η ποικιλία των γνωστών πρωτεϊνών που προσδένονται στο RPA είναι ήδη μεγάλος αλλά συνεχώς μεγαλώνει. Παρά την ποικιλία των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το RPA, το σύμπλεγμα αυτό φαίνεται ότι έχει πολύ περιορισμένο αριθμό περιοχών κατάλληλων για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις: μόνο τρεις περιοχές στο RPA70 και μία στο RPA32. Αυτό εγείρει το πρόβλημα εάν αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι ειδικές και εφόσον είναι πως η ειδικότητα επιτυγχάνεται για κάθε αλληλεπίδραση [52].

Η αλληλεπίδραση του FACT με το RPA φαίνεται ότι είναι σημαντική για την εναπόθεση των ακετυλιωμένων ιστονών H3 και H4 στα νουκλεοσώματα του νεοσυντιθέμενου DNA αλλά οι λεπτομέρειες αυτής της διαδικασίας και ο ρόλος τον οποίο φέρεται να παίζει το RPA παραμένουν αδιευκρίνιστα.

Το μεγαλύτερο μοτίβο πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης του RPA70 εκτείνεται στις περιοχές 70A και B (μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 168–308/327) και αναφέρεται ότι αλληλεπιδρά με της υπομονάδες «πριμάσης» της άλφα πολυμεράσης του DNA (άλφα-πριμάσης), το T αντιγόνο του SV40 T (που είναι επίσης ελικάση) και με τις πρωτεΐνες RecQ της οικογένειας ελिकासών του συνδρόμου Werner και Bloom [79,128].

4B. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RPA ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA

Σε περίπτωση βλάβης του DNA καθυστερεί ή αναστέλλεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. Αυτό επιτελείται μέσω των μεταβολικών μονοπατιών που ελέγχουν τις βλάβες και παρεμβαίνουν στα σημεία στα οποία αυτές συμβαίνουν για να τις διορθώσουν. Τα βασικά μονοπάτια ελέγχου και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA είναι τα εξής: [52,72,128]

A) το μονοπάτι των πρωτεϊνών (κινασών) ATR που ανταποκρίνονται κυρίως σε ελλείμματα (σπασίματα) που υπάρχουν σε μία μόνο αλυσίδα του DNA. Οι κινάσες στρατολογούνται στο σημείο αυτής της βλάβης μέσω της RPA όπου και συνδέονται με την χρωματίνη καθώς αναγνωρίζουν το σύμπλεγμα RPA-μονόκλωνου DNA μέσω του μικρού πρωτεϊνικού μορίου ATRIP. Όταν ενεργοποιούνται οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν και ρυθμίζουν πολλούς παράγοντες, όπως τις πρωτεΐνες Chk1 και Chk2. Το σύμπλεγμα RPA – μονόκλωνο DNA είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κινασών ATR. Πειράματα των τελευταίων ετών όμως καταδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση αυτή λαμβάνει χώρα και χωρίς τη συνδρομή της ενεργοποιημένης RPA πρωτεΐνης.

B) το μονοπάτι των πρωτεϊνών (κινασών) ATM οι οποίες ανιχνεύουν και κινητοποιούνται σε σπασίματα που συμβαίνουν και στις δύο αλυσίδες του DNA μέσω του συμπλέγματος Mre11/Rad50/Nbs1, γνωστού και ως συμπλεγματος MRN

Γ) το μονοπάτι του συμπλέγματος Rad9-Rad1-HuS1/Rad7-Rfc2-5. Το σύμπλεγμα τούτο μεταφέρεται στο σημείο της βλάβης ανεξάρτητα από τις κινάσες ATR και ATM και πυροδοτεί τις αντιδράσεις ελέγχου. Το Rad7-Rfc2-5 αναγνωρίζει την ένωση RPA – μονόκλωνο DNA και κινητοποιεί το Rad9-Rad1-HuS1 στο σημείο της βλάβης όπου η RPA και το 9-1-1 δρουν συνεργικά.

4Γ. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΗΣ RPA ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Λάθη στο DNA συμβαίνουν λόγω: α) αφαίρεσης βάσης, β) αφαίρεσης νουκλεοτιδίων, γ) λανθασμένου ζευγαρώματος μεταξύ ζευγών βάσεων και δ) λόγω θραύσης της διπλής έλικας. Στην επιδιόρθωση του DNA ενεργοποιούνται τα αντίστοιχα 4 βασικά μονοπάτια:

A) BER (Base Excission Repair, Μονοπάτι εκτομής βάσης)

B) NER (Nucleotide Excision Repair, Μονοπάτι εκτομής νουκλεοτιδίου)

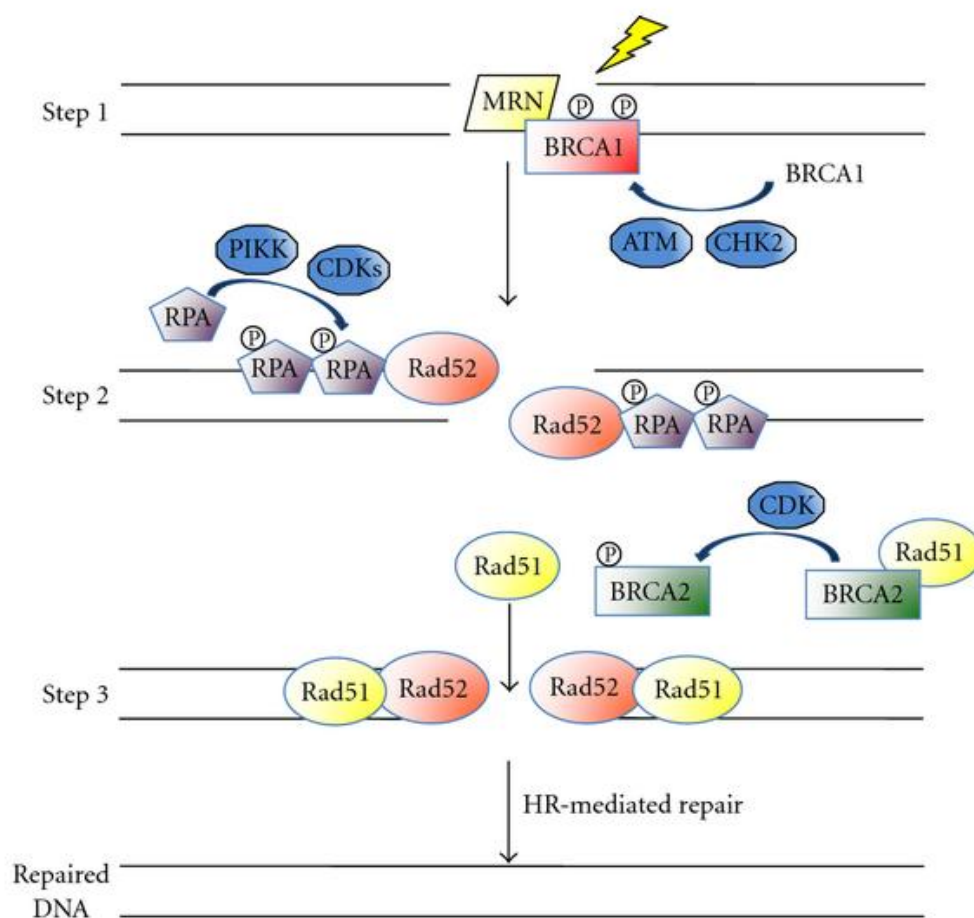
Γ) MMR (Mismatch Repair, Μονοπάτι επιδιόρθωσης λανθασμένου ζεύγους βάσεων)

Δ) DSB repair (double strand break repair, Μονοπάτι επιδιόρθωσης θραύσης της διπλής έλικας DNA). Η RPA πρωτεΐνη είναι απαραίτητη και στα τέσσερα επιδιορθωτικά μονοπάτια.

Όσον αφορά στο Μονοπάτι εκτομής βάσης (BER), η RPA συνεργάζεται με την ανθρώπινη ουρακιλ-DNA γλυκοσυλάση (UNG2) και συμμετέχει σε περιπτώσεις αντικατάστασης βάσεων που καλύπτουν μεγάλο μήκος στο DNA (long patch BER).

Όσον αφορά στο Μονοπάτι εκτομής νουκλεοτιδίου (NER), η RPA αρχικά αναγνωρίζει την βλάβη και στρατολογεί στην περιοχή τις ενδονουκλεάσες XPG και ERCC1-XPF. Αργότερα συνεργεί με το PCNA (κυκλίνη D), το RFC και τις πολυμεράσες του DNA δ και ε για να πληρωθεί το κενό που δημιουργείται από την εκτομή του νουκλεοτιδίου [22,72,79,103].

Όσον αφορά στο Μονοπάτι επιδιόρθωσης λανθασμένου ζεύγους βάσεων, η RPA ενεργοποιεί μία DNA ελικάση και αναστρέφει την αναδίπλωση. Όσον αφορά στην ομόλογη ανασυνδυαστική επιδιόρθωση των θραύσεων της διπλής έλικας του DNA η RPA δρα μαζί με τις πρωτεΐνες RAD51 και RAD52. Έχει αναφερθεί επίσης αλληλεπίδραση της RPA με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* και τις πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2 [22,72,79,103].



Εικόνα 6: RPA και επιδιόρθωση του DNA [22]

4Δ. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΥΠΕΡΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ RPA ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Είναι γνωστό για παραπάνω από μία δεκαετία ότι η RPA φωσφορυλιώνεται κυρίως στο αμινοτελικό άκρο της υπομονάδος RPA32, ανταποκρινόμενη τόσο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όσο και στην επίδραση τοξικών παραγόντων, αλλά τόσο η δομική όσο και η λειτουργική σημασία αυτών των τροποποιήσεων δεν είναι πλήρως κατανοητή.

Τα 33 αμινοτελικά αμινοξέα της υπομονάδας RPA32 του ανθρώπου περιέχουν τουλάχιστον 7 θέσεις οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν *in vivo* και *in vitro*, έτσι ώστε να προκύπτουν τέσσερις διαφορετικά φωσφορυλιωμένες μορφές, οι οποίες και αναγνωρίζονται σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες τροποποιούν τα κατάλοιπα

σερίνης 23 και σερίνης 29 στα μιτωτικά κύτταρα, μειώνοντας έτσι την ικανότητα της φωσφορυλιωμένης RPA πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με την πολυμεράση α του DNA (πριμάση), την κινάση ATM και την DNA-PK. Οι DNA-PK, ATM και ATR συμμετέχουν στην τροποποίηση των θρεονινών 21 και 23 σε απάντηση στους διάφορους τοξικούς παράγοντες *in vivo*, οδηγώντας σε υπερφωσφορυλίωση της RPA. Οι υπερφωσφορυλιωμένες μορφές της RPA περιέχουν επιπλέον τις φωσφορυλιωμένες σερίνες 4 και 8 και μία τουλάχιστον φωσφοσερίνη στα κατάλοιπα 11-13, αλλά οι κινάσες που είναι υπεύθυνες για τις τροποποιήσεις αυτές *in vivo* δεν είναι γνωστές. Είναι ενδιαφέρον ότι οι κινάσες που είναι υπεύθυνες για την υπερφωσφορυλίωση και η ίδια η κινητική της υπερφωσφορυλίωσης της RPA ποικίλει αναλόγως του παράγοντα που προκαλεί τη βλάβη. Η φωσφορυλίωση των RPA και της ιστόνης H2AX γάμμα εξαρτάται από την κινάση ATR και συμβαίνει άμεσα μετά την επίδραση καμπτοθεκίνης στα κύτταρα. Εντούτοις, η υπερφωσφορυλίωση της RPA32 συμβαίνει αργότερα και απαιτεί την ενζυματική δραστηριότητα της κινάσης DNA-PK. Η ίδια κινάση (η DNA-PK) απαιτείται επίσης για την υπερφωσφορυλίωση της RPA σε απόκριση της έκθεσης των κυττάρων στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η φωσφορυλίωση και υπερφωσφορυλίωση της RPA που εξαρτάται από την κινάση ATR συμβαίνουν πολύ αργά μετά από έκθεση των κυττάρων σε υδροξυουρία, αλλά στην περίπτωση αυτή η υπερφωσφορυλίωση δεν εξαρτάται από την DNA-PK. Τα Rad51, Rad52 καθώς και η κινάση ATR έχει αναφερθεί πως ανοσοκατακρημνίζονται ειδικά με την υπερφωσφορυλιωμένη μορφή RPA σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ανθρώπινων κυττάρων εκτεθειμένων σε καμπτοθεκίνη ή υπεριώδη ακτινοβολία αλλά βέβαια δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι άμεσες ή έμμεσες [33,121].

Ακόμη, το αν οι θέσεις φωσφορυλίωσης της RPA σχετίζονται με συγκεκριμένες αλλαγές στη στερεοδιάταξη της ή στη λειτουργία της παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα. Για παράδειγμα η μεταλλαγή της θρεονίνης 21 και της σερίνης 33 της RPA32 ή και των δύο ταυτόχρονα έχει πολύ μικρή επίδραση στην επαγόμενη από καμπτοθεκίνη υπερφωσφορυλίωση της RPA32.

Είναι γνωστό ότι η εισαγωγή ενός τεράστιου αρνητικού φορτίου στο αμινοτελικό άκρο της υπομονάδας RPA32 θα ήταν ικανή να αλλάξει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Βασισμένοι σε αυτή την παραδοχή κάποιες προσπάθειες για τη διαλεύκανση της δομικής και λειτουργικής σημασίας της υπερφοσφορυλίωσης της RPA επιστρατεύουν μεταλλαγές της RPA σχεδιασμένες έτσι ώστε να μιμηθούν την υπερφοσφορυλιωμένη πρωτεΐνη με το να υποκαθιστούν τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου της RPA32 με ασπαρτικό ή βέβαια, με αλανίνη ως αρνητικό μάρτυρα ελέγχου. Η αρνητικά φορτισμένη στο αμινοτελικό άκρο μεταλλαγμένη RPA32 υπομονάδα αποκλείεται από τις αντιγραφικές εστίες σε ανθρώπινα κύτταρα και μάλιστα αυτός ο αποκλεισμός είναι ανάλογος του αρνητικού φορτίου που φέρει το μόριο. Η μεταλλαγμένη μορφή που φέρει κατάλοιπα αλανίνης αντίθετα δεν αποκλείεται από αυτές τις θέσεις. Αντίστοιχα, η υπερφοσφορυλιωμένη RPA (wild type) αποκλείεται από τα αντιγραφικά κέντρα. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συμβατά με την παρατήρηση ότι η υπερφοσφορυλιωμένη RPA έχει μειωμένη συγγένεια για αλληλεπίδραση με την πολυμεράση α του DNA (πριμάση) [11,27].

Το ερώτημα που δημιουργείται είναι μήπως η υπερφοσφορυλιωμένη στο αμινοτελικό άκρο RPA32 υπομονάδα αλλάζει τη δομή του συμπλέγματος RPA και αν ναι πως το πραγματοποιεί αυτό; Πρώιμες έρευνες πάνω στον τρόπο με τον οποίο η ανθρώπινη RPA πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με το μονόκλωνο DNA με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης αναδεικνύουν ότι το αμινοτελικό άκρο της RPA32 υπομονάδας προσδεμένο έτσι ώστε να καλύπτει 30 νουκλεοτίδια σε μήκος είναι ειδικά υπερφοσφορυλιωμένη από την κινάση DNA-PK, πράγμα το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι το αμινοτελικό άκρο της RPA32 είναι περισσότερο προσβάσιμο στη στερεο-διαμόρφωση εκείνη που καλύπτει τα 30 νουκλεοτίδια μονόκλωνου DNA από τις άλλες στερεοδιαμορφώσεις που μπορεί να πάρει το μόριο αυτό και στις οποίες το αμινοτελικό άκρο της RPA32 μπορεί να είναι περισσότερο «συμπαγές». Δεδομένης της αφόρτιστης κατάστασης του μη τροποποιημένου αμινοτελικού άκρου της RPA32 είναι εύκολο να υποθέσουμε ότι η μαζική εισαγωγή φορτίου

μπορεί να καθιστά δύσκολη την αντιστροφή της εκτεταμένης πρόσδεσης της RPA στο μονόκλωνο DNA και επομένως δύσκολη και την επαναφορά του αμινοτελικού άκρου της RPA32 στην πρότερη κατάσταση. Η υπερφοσφορυλίωση θα έπρεπε λοιπόν να ευνοεί τη ροπή της κατάστασης ισορροπίας προς την εκτεταμένη μορφή της RPA η οποία προσδένεται στο μονόκλωνο DNA με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι οι « συμπαγείς » μορφές.

Χαμηλότερα επίπεδα υπερφοσφορυλιωμένης RPA πρωτεΐνης ευρισκόμενα στη « συμπαγή » μορφή θα μπορούσαν να εξηγήσουν τον αποκλεισμό της από την αντιγραφόμενη χρωματίνη εφόσον τα 8-10 νουκλεοτίδια που καλύπτονται από τέτοια μόρια θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη γρήγορη εναλλαγή της RPA εντός και εκτός του μονόκλωνου DNA κατά την αντιγραφή. Επιπρόσθετα ο μεγαλύτερος βαθμός συγγένειας προς το DNA της εκτεταμένης μορφής της RPA εξασφαλίζει ότι το μονόκλωνο DNA όταν εκτίθεται σε τοξικούς παράγοντες προστατεύεται από το να δημιουργήσει αντικανονικές φουρκέτες ή και από τη δράση νουκλεασών μέχρι την ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης. Αντίθετα όμως με αυτές τις υποθέσεις η πρόσδεση της υπερφοσφορυλιωμένης RPA σε 8-10 νουκλεοτίδια μονόκλωνου DNA και σε αντίστοιχα παρόμοια *in vitro* υποστρώματα δεν παρουσιάζεται ούτε μειωμένη ούτε ίση σε σχέση με αυτή της μη τροποποιημένης RPA. Αυτό το παράδοξο εύρημα παραμένει άλυτο μέχρι τώρα. Ομοίως, πρόσφατες *in vitro* μελέτες προτείνουν ότι το υπερφοσφορυλιωμένο αμινοτελικό άκρο της RPA32 μπορεί να ανταγωνίζεται το μονόκλωνο DNA για πρόσδεση σε μία βασική αύλακα του αμινοτελικού άκρου της RPA70 ή στην RPA70B . Αυτά τα ευρήματα είναι συμβατά με το γεγονός ότι τη υπερφοσφορυλιωμένη RPA δεν εντοπίζεται στα χρωμοσωμικά αντιγραφικά κέντρα αλλά δεν εξηγούν το πως το μονόκλωνο DNA παραμένει προστατευμένο σε κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί γονοτοξική βλάβη. Έτσι σημαντική δουλειά απαιτείται ακόμη προκειμένου να γίνει κατανοητή η επίδραση της υπερφοσφορυλίωσης του αμινοτελικού άκρου της RPA32 υπομονάδας στην τεταρτοταγή δομή της RPA πρωτεΐνης [27,42,47].

B. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΩΟΘΗΚΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί την πλέον επικίνδυνη νεοπλασία του γεννητικού συστήματος, η επίπτωση του είναι 6% στο δυτικό κόσμο και αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο του γυναικολογικού συστήματος. Οι προσπάθειες για έγκαιρη διάγνωση καθώς και νέα θεραπευτικά σχήματα εμφανίζουν περιορισμένη επιτυχία κυρίως λόγω του γεγονότος ότι η προέλευση και η παθογένεση των επιθηλιακών όγκων της ωοθήκης είναι άγνωστη. Μολονότι έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την ανάδειξη προκαρκινικών αλλοιώσεων στις ωοθήκες, καμία από αυτές δεν έχει δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Για αυτόν τον λόγο υποστηρίζεται ότι ο καρκίνος των ωοθηκών αναπτύσσεται *de novo*. Σύμφωνα με μελέτες ο επιθηλιακός όγκος των ωοθηκών δεν αποτελεί μοναδική οντότητα, αλλά αποτελεί ένα σύνολο διαφορετικών τύπων νεοπλασμάτων, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν βάσει μορφολογικών και μοριακών γενετικών χαρακτηριστικών. Η πρώτη ομάδα καρκίνων, **ο Τύπος I**, αποτελείται από τα χαμηλού βαθμού κακοηθείας ορώδη, τα ενδομητριοειδή, τα διαυγοκυτταρικά, τα βλεννώδη και τα μεταπλαστικά (Brenner) καρκινώματα. Αυτοί οι καρκίνοι γενικά δεν παρουσιάζονται με άλγος, περιορίζονται στις ωοθήκες και γενικώς είναι γενετικά σταθεροί. Δεν παρουσιάζουν μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53* αλλά κάθε ιστολογικός τύπος εμφανίζει ένα διαφορετικό μοριακό γενετικό προφίλ. Επιπλέον, αυτός ο τύπος καρκίνου παρουσιάζει κοινή γενεαλογία με το αντίστοιχο καλόηθες κυστικό νεόπλασμα συνήθως μέσα από ένα ενδιάμεσο στάδιο (όγκος οριακής κακοήθειας-borderline tumor), γεγονός που υποστηρίζει την μορφολογική συνέχεια της πορείας του καρκίνου.

Αντιθέτως, μια άλλη ομάδα καρκίνων, **ο Τύπος II**, είναι εξαιρετικά επιθετικοί, αφού αναπτύσσονται ταχέως και σχεδόν πάντα την στιγμή της διάγνωσης οι ασθενείς βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τα υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδη καρκινώματα, τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα και τα καρκινοσαρκώματα (κακοήθεις μικτοί

Μυλλεριανοί όγκοι). Εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53* σε πάνω από το 80% των περιπτώσεων, ενώ σπάνια παρουσιάζουν τις μεταλλάξεις που ανευρίσκονται στους καρκίνους Τύπου Ι [2,48,132]. Πιο αναλυτικά οι διαφορές των δύο τύπων φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Διαφορές Τύπου Ι και ΙΙ όγκων των ωοθηκών

	ΤΥΠΟΥ Ι	ΤΥΠΟΥ ΙΙ
Επιθετικότητα	Μικρή	Μεγάλη
Ανάπτυξη	Σταδιακή	Ταχεία
Προχωρημένο στάδιο στη διάγνωση	Όχι	Ναι
TP53 μετάλλαξη	Όχι	Ναι

Πρόσφατες έρευνες παρείχαν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία πως αυτό που μέχρι πρότινος θεωρούνταν πρωτογενές καρκίνωμα των ωοθηκών τελικά ξεκινά από άλλα όργανα της πυέλου. Προτείνεται ότι τα ορώδη νεοπλάσματα ξεκινούν από την εμφύτευση σαλπγγικού επιθηλίου (καλοήθους ή κακοήθους). Τα ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικά νεοπλάσματα συνδυάστηκαν με την παρουσία ενδομητρίωσης, λόγω παλίνδρομης εμμηνορρυσίας. Τέλος, έρευνες σε εξέλιξη δείχνουν πως τα βλεννώδη και τα μεταπλαστικά νεοπλάσματα (Brenner) των ωοθηκών προκύπτουν από μεταπλασθέν επιθήλιο που αναπτύσσεται στο σαλπγγο-μεσοθηλιακό σύνδεσμο.

Ταξινόμηση

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά και ο βαθμός κακοήθειας των νεοπλασμάτων της ωοθήκης παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία, η οποία εκφράζεται και με τις ιδιαιτερότητες στην κλινική συμπεριφορά τους[63,100]. Η περισσότερο πρακτική και συχνότερη σε χρήση ταξινόμηση τους είναι αυτή που στηρίζεται στην ιστογενετική τους προέλευση και παρουσιάζεται στον πίνακα 3:

Πίνακας 3: Ταξινόμηση νεοπλασμάτων των ωοθηκών
1. Όγκοι από το επιφανειακό επιθήλιο 2. Όγκοι από τα γεννητικά κύτταρα 3. Όγκοι από το εξειδικευμένο (λειτουργικό) μεσέγχυμα 4. Όγκοι από το μη λειτουργικό μεσέγχυμα 5. Μεταστατικοί όγκοι

Στην ωοθήκη υπάρχουν 4 βασικά είδη ιστών με διαφορές στην προέλευση και τη λειτουργικότητα.

1) Το επιφανειακό επιθήλιο που την περιβάλλει: Προέρχεται από το επιθήλιο της σπλαχνικής κοιλότητας του εμβρύου (μεσόδερμα) και μπορεί να θεωρηθεί ως τροποποιημένο μεσοθήλιο. Έχει κοινή προέλευση με το επιθήλιο του περιτοναίου και τα κύτταρα του μπορούν να υποστούν μετάπλαση. Από το επιφανειακό επιθήλιο προέρχονται οι επιθηλιακοί όγκοι οι οποίοι παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Ιστολογική ταξινόμηση επιθηλιακών όγκων
• Ορώδεις • Βλεννώδεις • Ενδομητριοειδείς • Διαυγοκυτταρικοί • Όγκοι Brenner • Αδιαφοροποίητα καρκινώματα • Καρκινοσαρκώματα και μικτοί μεσοδερματικοί όγκοι

2) Τα γεννητικά κύτταρα: Αυτά πρωτοεμφανίζονται στο λεκιθικό ασκό του εμβρύου (αρχέγονα γεννητικά κύτταρα) και από εκεί μεταναστεύουν κατά μήκος της ρίζας του μεσεντερίου για να συναντήσουν τον αρχέγονο γεννητικό αδέν. Αυτός πρωτοσχηματίζεται κατά την έκτη εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής ως πάχυνση του επιθηλίου (γεννητική ταινία) στη σπλαχνική κοιλότητα. Τα

γεννητικά κύτταρα εγκαθίστανται στο υποκείμενο μεσέγγυμα. Από τα κύτταρα αυτά προέρχονται οι όγκοι των γεννητικών κυττάρων.

3) Το εξειδικευμένο μεσέγγυμα: Αποτελείται από τα κύτταρα που παράγουν τις ορμόνες του θήλεως (τα κοκκώδη και τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου) και τα υπολείμματα των κυττάρων του αρχέγονου γεννητικού αδένου που προορίζονται για την παραγωγή ανδρογόνων και σπερματοζωαρίων (κύτταρα Leydig και Sertoli). Ανάλογα με την προέλευση και τη σύσταση τους οι όγκοι από τα παραπάνω κύτταρα, παρουσιάζουν την ανάλογη ορμονοπαραγωγή και κλινική συμπεριφορά.

4) Μη ειδικό μεσέγγυμα: Είναι ο στηρικτικός ιστός της ωοθήκης (συνδετικός ιστός, αγγεία, λίπος από τον οποίο μπορούν να προέλθουν καλοήθεις αλλά και κακοήθεις όγκοι (σαρκώματα).

Οι επιθηλιακοί καρκίνοι των ωοθηκών αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία των κακοήθων όγκων της ωοθήκης και είναι σχεδόν ταυτόσημοι με την έννοια του ωοθηκικού καρκίνου. Τα κυτταρικά χαρακτηριστικά τους προσομοιάζουν με το επιθήλιο ενός από τα γεννητικά όργανα. Τα ορώδη νεοπλάσματα είναι τα συχνότερα (75-80%) και ιστολογικά τα νεοπλασματικά κύτταρα που τα απαρτίζουν είναι παρόμοια με το επιθήλιο της σάλπιγγας. Τα ενδομητριοειδή και τα βλεννώδη νεοπλάσματα είναι λιγότερο συχνά (περίπου 10%) και περιλαμβάνουν κύτταρα που προσομοιάζουν στο επιθήλιο του ενδομητρίου και του ενδοτραχήλου αντίστοιχα. Σπανιότεροι επιθηλιακοί καρκίνοι των ωοθηκών είναι τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα, τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα, οι όγκοι Brenner και τα μικτά νεοπλάσματα [95,132].

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος των ωοθηκών εμφανίζει μεγαλύτερη επίπτωση στις γυναίκες ηλικίας 55-65 ετών. Στην πραγματικότητα, η συχνότητα της νόσου αυξάνεται διαρκώς σε όλη τη διάρκεια της ζωής, μέχρι την ηλικία των 80 ετών. Ιδιαίτερα συχνός είναι στη Β.Αμερική (ΗΠΑ). Χαμηλή επίπτωση παρατηρείται σε χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας (Ιαπωνία). Είναι χαρακτηριστικό το

γεγονός ότι τα παιδιά των Ιαπώνων που έχουν μεταναστεύσει στις ΗΠΑ παρουσιάζουν αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη επιθηλιακών καρκίνων ωοθηκών που προσεγγίζει τον κίνδυνο των ανεπτυγμένων χωρών του Δυτικού κόσμου. Θεωρείται λοιπόν ότι οι αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου σχετίζονται με το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής που χαρακτηρίζει τις δυτικές βιομηχανικές χώρες [63,132].

Ο καρκίνος της ωοθήκης προσβάλλει συνήθως γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών (80-90%). Η πιθανότητα παρουσίας κακοήθειας (οριακής ή διηθητικής νόσου) σε ένα νεόπλασμα ωοθήκης, το οποίο αναπτύσσεται σε γυναίκες νεότερες των 40, είναι περίπου 1/10. Ο κίνδυνος αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία αυτή και μετά την εμμηνόπαυση προσεγγίζει το 1/3. Λιγότερες από 1 στις 100 περιπτώσεις αφορούν σε γυναίκες μικρότερες των 20 ετών. Στις νεαρές αυτές ηλικίες οι όγκοι της ωοθήκης προέρχονται κατά τα 2/3 από τα γεννητικά κύτταρα[105] (πίνακας 5).

Πίνακας 5: Συχνότητα των νεοπλασμάτων των ωοθηκών ανάλογα με την ηλικία.

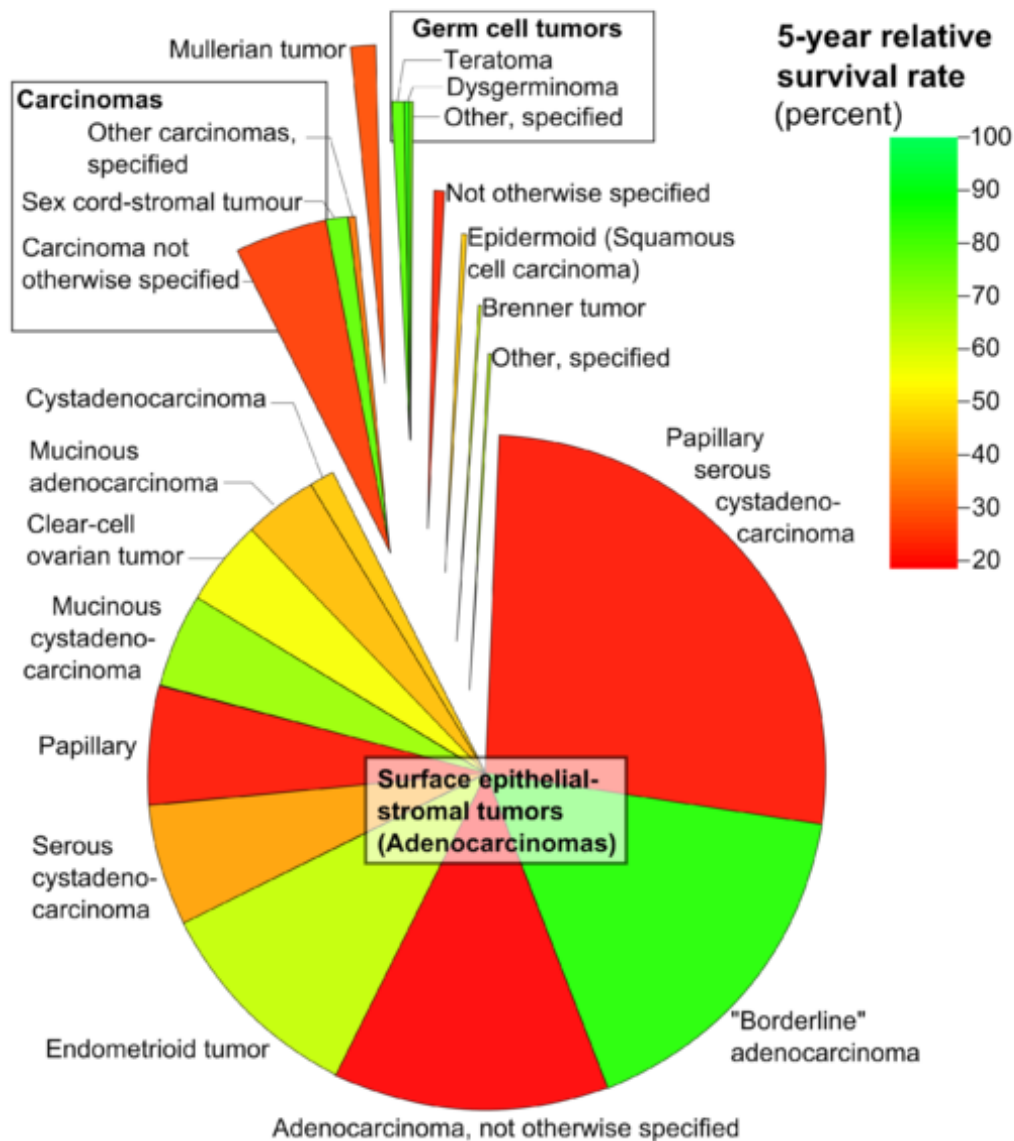
Είδος όγκων	Ηλικιακές ομάδες		
	<20 ετών	20-50ετών	>50 ετών
Επιθηλιακοί	29%	71%	81%
Από γεννητικά κύτταρα	59%	14%	6%
Από λειτουργικό μεσέγχυμα	8%	5%	4%
Από μη λειτουργικό μεσέγχυμα	4%	10%	9%

3. ΟΓΚΟΙ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ-ΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ (ΚΟΙΝΟΙ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΟΓΚΟΙ)

Τα νεοπλάσματα αυτής της κατηγορίας θεωρείται ότι προέρχονται από το επιθήλιο της επιφανείας της ωοθήκης και υποκείμενο στρώμα [129,132]. Στο σύνολο των ωοθηκικών νεοπλασμάτων, οι κοινοί επιθηλιακοί όγκοι

καταλαμβάνουν το 50-55% ενώ στο σύνολο των κακοηθών ωοθηκικών όγκων, τα νεοπλάσματα αυτά αποτελούν περίπου το 90% (εικόνα 7).

Incidence of ovarian cancers by histopathology



Εικόνα 7: Επίπτωση των νεοπλασμάτων των ωοθηκών ανά ιστολογικό τύπο [154].

Για την ταξινόμηση και την ονοματολογία των κοινών επιθηλιακών όγκων, λαμβάνονται υπ'όψιν τα εξής κριτήρια:

1. Τύπος επιθηλίου: Ορώδες, βλεννώδες, ενδομητριοειδές, διαυγοκυτταρικό, μεταβατικό, πλακώδες.

2. Το ποσό του στρωματικού στοιχείου: αν είναι > 50% προστίθεται στην ονομασία τους η κατάληξη -ίνωμα (π.χ. ορώδες αδενοϊνίωμα). Εάν συνυπάρχουν κύστεις > 1 εκ., ο όγκος ονομάζεται κυσταδενοϊνίωμα.
3. Ατυπία / παρουσία διήθησεως του στρώματος: Οι παράμετροι αυτές καθορίζουν και τη βιολογική συμπεριφορά αυτών των νεοπλασμάτων: Τα νεοπλάσματα που στερούνται ατυπίας ανήκουν στην **καλοήγη** κατηγορία (κυσταδενώματα). Τα νεοπλάσματα που έχουν ατυπία κι εμφανίζουν διήθηση του στρώματος χαρακτηρίζονται ως **κακοήγη** (καρκινώματα). Τέλος οι επιθηλιακοί όγκοι που έχουν υπερπλασία κι ατυπία του επιθηλίου χωρίς όμως να εμφανίζουν διήθηση του στρώματος χαρακτηρίζονται ως **οριακής κακοηθείας** νεοπλάσματα. Τα περισσότερα νεοπλάσματα αυτής της κατηγορίας είναι ορώδη.

3Α. ΟΡΩΔΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Στην κατηγορία αυτή το 60% αντιστοιχεί σε καλοήγη νεοπλάσματα, το 10% σε οριακής κακοηθείας και το 30% σε καρκινώματα. [119,123]

3Α1. ΟΡΩΔΕΣ ΚΥΣΤΑΔΕΝΩΜΑ

Το ορώδες κυσταδένωμα αποτελεί το 25% των καλοήθων ωοθηκικών όγκων. Η μέση ηλικία των ασθενών είναι 46 έτη. Το νεόπλασμα είναι αμφοτερόπλευρο στο 7-20% των περιπτώσεων. Μακροσκοπικά είναι συνήθως ένας μονόχωρος, κυστικός όγκος με ομαλή εξωτερική επιφάνεια. Όταν συνυπάρχει σημαντικό στρωματικό στοιχείο ή θηλωματώδης επιφανειακή ανάπτυξη χρησιμοποιούνται οι όροι ορώδες κυσταδενοϊνίωμα ή ορώδες, θηλώδες με επιφανειακή ανάπτυξη (surface papillary) κυσταδένωμα. Μικροσκοπικά η κύστη επενδύεται από μονόστοιβο, ορώδους τύπου (όπως δηλ. της σάλπιγγος) επιθήλιο. Οι θηλές (εάν υπάρχουν) είναι συνήθως βραχείες με άφθονο συνδετικό υπόστρωμα και ομοίως επικαλύπτονται από μονόστοιβο ορώδες επιθήλιο.

3Α2. ΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΟΡΩΔΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Η κατηγορία των οριακής κακοηθείας ωοθηκικών νεοπλασμάτων αναγνωρίστηκε ως ξεχωριστή κατηγορία το 1971 από την FIGO και συμπεριελήφθη το 1973 από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) στην ταξινόμηση των ωοθηκικών νεοπλασμάτων. Στην ταξινόμηση αυτή ως οριακής κακοηθείας ορίστηκαν εκείνα τα νεοπλάσματα, που ιστολογικά εμφάνιζαν επιθηλιακή υπερπλασία και ατυπία, χωρίς να εμφανίζουν όμως διήθηση του στρώματος, γεγονός που χαρακτηρίζει τα καρκινώματα. Τα οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα μπορεί να έχουν αμφοτερόπλευρη ανάπτυξη, να συνοδεύονται από εμφυτεύσεις στην πύελο ή την περιτοναϊκή κοιλότητα ή, ακόμη, να έχουν λεμφαδενικές εντοπίσεις. Τα φαινόμενα αυτά θεωρούνται ότι σε πολλές περιπτώσεις αποτελούν πολυεστιακή εκδήλωση της νόσου μάλλον παρά «μεταστάσεις», όπως τις εννοούμε σε άλλα νεοπλάσματα. Η διάγνωση των οριακής κακοηθείας ορώδων νεοπλασμάτων βασίζεται στην μορφολογία του ωοθηκικού όγκου και είναι ανεξάρτητη από την έκταση της νόσου. Η έκταση της νόσου (εμφυτεύσεις ή και λεμφαδενικές εντοπίσεις) είναι παράμετροι που καθορίζουν το στάδιο και την πρόγνωση (πυελικές εμφυτεύσεις: στάδιο II, περιτοναϊκές εμφυτεύσεις / λεμφαδενικές εντοπίσεις σε επιχώριους λεμφαδένες: στάδιο III). Οι περισσότεροι ασθενείς (70%) με οριακής κακοηθείας ορώδες ωοθηκικό νεόπλασμα είναι σταδίου I (ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη ωοθηκική ανάπτυξη). Η μέση ηλικία των ασθενών με οριακής κακοηθείας ορώδες ωοθηκικό νεόπλασμα είναι τα 46 έτη. Μακροσκοπικά, ο όγκος είναι κυστικός, μονόχωρος ή πολύχωρος κι έχει αμφοτερόπλευρη εντόπιση στο 30% των περιπτώσεων. Η εσωτερική επιφάνεια της κύστεως καλύπτεται εστιακά ή σε μεγάλη έκταση από θηλές. Συχνά παρατηρείται ανάπτυξη θηλών και στην εξωτερική επιφάνεια του όγκου (50%). Μικροσκοπικά το επιθήλιο που επενδύει την/τις κύστες και τις θηλές εμφανίζει στιβάδωση, ποικίλου βαθμού ατυπία και μιτωτική δραστηριότητα. Σπάνια μπορεί το επιθήλιο να είναι κακήθες (οριακής κακοηθείας νεόπλασμα με ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα). Συχνά το επιθήλιο σχηματίζει πολύπλοκες διακλαδιζόμενες καταδύσεις μέσα στο υποκείμενο στρώμα. Οι καταδύσεις

αυτές δεν θα πρέπει να συγχέονται με διήθηση του στρώματος, που εξ ορισμού πρέπει να απουσιάζει για να θεωρηθεί ο όγκος ως οριακής κακοηθείας. Μία ιδιαίτερη μορφολογία στην κατηγορία των οριακής κακοηθείας ορώδων νεοπλασμάτων είναι η μικροθηλώδης [141,155]. Τα μικροθηλώδη ορώδη νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται από πολύπλοκες διακλαδιζόμενες θηλές (δίκην κεφαλής Μέδουσας), με μήκος πενταπλάσιο του πλάτους τους, που ξεκινούν από ευρείες θηλές με άφθονο, ινώδες, οιδηματώδες ή μυξωματώδες στρώμα, οι ίδιες όμως συνήθως δεν έχουν αγγειοσυνδετικό άξονα. Συχνά οι θηλές αυτές συνενώνονται κι έχουν ηθμοειδή διαμόρφωση. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν μικρή, το πολύ μέτρια ατυπία, λίγο κυτταρόπλασμα και πολύ μικρή μιτωτική δραστηριότητα. Η περιοχή με τη μικροθηλώδη διαμόρφωση θα πρέπει να έχει διάμετρο τουλάχιστον 5 χιλ., σε μία τουλάχιστον ιστολογική τομή για να χαρακτηριστεί ένα οριακής κακοηθείας ορώδες νεόπλασμα ως μικροθηλώδους τύπου. Τα οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα με μικροθηλώδη διαμόρφωση αποτελούν το 12% των νεοπλασμάτων αυτής της κατηγορίας [23,140].

Η δειγματοληψία στα οριακής κακοηθείας νεοπλάσματα επιβάλλεται να είναι εκτεταμένη (τουλάχιστον 1 τομή/εκ. διαμέτρου του όγκου) για να αξιολογηθεί με ασφάλεια η πιθανότητα παρουσίας διηθήσεως του στρώματος. Η παρουσία νεοπλασματικής αναπτύξεως στην επιφάνεια του όγκου πρέπει να επιβεβαιώνεται και μικροσκοπικά. Το εύρημα αυτό συνοδεύεται σε υψηλό ποσοστό (90%) από εξω-ωοθηκικές εμφυτεύσεις. Οι εμφυτεύσεις ιστολογικά διακρίνονται σε μη διηθητικές (επιθηλιακού ή δεσμοπλαστικού τύπου) και διηθητικές. Οι μη διηθητικές επιθηλιακές εμφυτεύσεις αφορίζονται σαφώς από τον υποκείμενο φυσιολογικό ιστό. Στο επίπλουν αναπτύσσονται με τη μορφή λεπτών ταινιών κατά μήκος των λοβίων του λιπώδους ιστού. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν ελαφρά έως μέτρια ατυπία κι αναπτύσσονται κατά θηλές, μικρές αθροίσεις ή και μεμονωμένα. Στις μη διηθητικές εμφυτεύσεις δεσμοπλαστικού τύπου το κύριο εύρημα είναι η παρουσία αντιδραστικού στρώματος που εντοπίζεται στην περιτοναϊκή επιφάνεια ή καταδύεται κατά μήκος των λοβίων του επιπλοϊκού λιπώδους ιστού. Μέσα σε

αυτό το αντιδραστικό στρώμα υπάρχουν λίγα νεοπλασματικά κύτταρα, μικροί αδενικοί σχηματισμοί και ψαμμώδη σωμάτια. Συνυπάρχει μικτού τύπου φλεγμονώδης διήθηση. Συχνά παρατηρείται νέκρωση, αιμορραγία και εναποθέσεις ινικής [132,142].

Οι διηθητικές εμφυτεύσεις χαρακτηρίζονται από ανώμαλη διήθηση του υποκειμένου ιστού με κατάργηση της φυσιολογικής λοβίωσης του επιπλοϊκού λιπώδους ιστού και διήθηση του. Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν συνήθως έντονη ατυπία (μοιάζουν με καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα) κι αναπτύσσονται κατά θηλές, αδενικούς σχηματισμούς, ηθμοειδείς δομές ή και μεμονωμένα. Για τον καθορισμό του είδους των εμφυτεύσεων η βιοψία θα πρέπει απαραίτητως να περιλαμβάνει και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Οι εμφυτεύσεις μπορεί να είναι αμιγώς μη-διηθητικές ή αμιγώς διηθητικές ή, τέλος, να συνυπάρχουν οι δύο μορφές τους. Η διαφορική διάγνωση των εμφυτεύσεων περιλαμβάνει την ενδοσαλπγγίωση, η οποία χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη υπό το μεσοθήλιο απλών αδένων ή/και θηλών με σαλπγγικού τύπου επιθήλιο, χωρίς ατυπία. Μπορεί να συνυπάρχουν και ψαμμώδη σωμάτια. Και στην περίπτωση των εμφυτεύσεων η δειγματοληψία του επιπλόου θα πρέπει να είναι εκτεταμένη, ακόμη κι όταν αυτό μακροσκοπικά φαίνεται ως φυσιολογικό. Όταν το επίπλουν έχει μακροσκοπικά εντοπισμένες αλλοιώσεις, η δειγματοληψία θα πρέπει πάλι να είναι εκτεταμένη (από όλες τις εστίες) για να καθορισθεί ο τύπος των εμφυτεύσεων (διηθητικές, μη διηθητικές). Από τους ασθενείς με εξω-ωοθηκική εντόπιση της νόσου (δηλ. σε στάδιο II-III), που αποτελούν το 30-35% των ασθενών με οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα, το 67-88% έχουν μη διηθητικές εμφυτεύσεις ενώ το 33-12% έχουν διηθητικές εμφυτεύσεις. Το είδος των εμφυτεύσεων έχει μεγάλη σημασία για την πρόγνωση: Από τους ασθενείς με μη διηθητικές εμφυτεύσεις το 18% εμφανίζει υποτροπή της νόσου και το 6% πεθαίνει από τη νόσο. Από τους ασθενείς με διηθητικές εμφυτεύσεις το 36% εμφανίζει υποτροπή της νόσου και το 25% πεθαίνει από τη νόσο. Οι ασθενείς με μικροθηλώδους τύπου οριακής κακοηθείας ορώδες νεόπλασμα εμφανίζουν σε υψηλό ποσοστό εμφυτεύσεις (48-75%), οι οποίες συχνά είναι διηθητικές (16%).

Αν και ο αρχικός ορισμός της ΠΟΥ για τα οριακής κακοηθείας νεοπλάσματα περιλαμβάνει την απουσία διηθήσεως του στρώματος στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται και οι ασυνήθεις περιπτώσεις (11% των οριακής κακοηθείας ορώδων νεοπλασμάτων) με «μικροδιήθηση» του στρώματος. Η μικροδιήθηση του στρώματος χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών διάσπαρτων διηθητικών εστιών (1-8). Οι εστίες αυτές είναι μικρότερες σε διάμετρο των 3 χιλ. (10 mm^2) και αποτελούνται από αδενικούς σχηματισμούς, θηλές ή μεμονωμένα κύτταρα, συχνά με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηριστικά δεν συνοδεύονται από αντίδραση του στρώματος. Συχνά οι μικρές θηλές της μικροδιηθητικής εστίας περιβάλλονται από διαυγαστική περιοχή. Εστιακά μπορεί να υπάρχει λεμφαγγειακή διήθηση (10%). Τα οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα με μικροδιήθηση του στρώματος (έτσι όπως ορίζεται ανωτέρω) φαίνεται ότι έχουν παρόμοια πρόγνωση με τα οριακής κακοηθείας νεοπλάσματα που δεν εμφανίζουν μικροδιήθηση [63,132].

Τριάντα χρόνια μετά τον διαχωρισμό στην ταξινόμηση του ΠΟΥ των οριακής κακοηθείας όγκων από τα κακοήγη ορώδη νεοπλάσματα, η κατηγορία αυτή φαίνεται ότι είναι ετερογενής: 80-90% των ασθενών έχουν πολύ καλή πρόγνωση. Μερικές ασθενείς υποτροπιάζουν ακόμη και 10 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση (παρουσία νέων εστιών) ενώ ένα μικρό ποσοστό (10-15%) καταλήγει από τη νόσο. Οι κακής προγνώσεως περιπτώσεις είναι εκείνες που έχουν διηθητικές εμφυτεύσεις ή μικροθηλώδη υφή. Έτσι η κατηγορία των οριακής κακοηθείας ορώδων νεοπλασμάτων μπορεί να διαχωρισθεί σε «καλοήγη» και «κακοήγη». Η «κακοήγη» κατηγορία, που μπορεί να χαρακτηριστεί ως χαμηλού βαθμού κακοηθείας καρκίνωμα, περιλαμβάνει τα νεοπλάσματα με διηθητικές εμφυτεύσεις. Όλα τα υπόλοιπα οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα είναι «καλοήγη». Για αυτά τα «καλοήγη» οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα έχει προταθεί ο όρος «ορώδες νεόπλασμα με εστιακή ατυπία» (atypical proliferating serous tumor). Αν και γίνονται προσπάθειες στην βιβλιογραφία για την καθιέρωση του, ο όρος αυτός δεν έχει γίνει ευρέως αποδεκτός. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πρόγνωση των

οριακής κακοηθείας ορώδων νεοπλασμάτων είναι πολύ καλή με δεκαετή επιβίωση για ασθενείς σταδίου I, II, III, 90-95% (τα αντίστοιχα ποσοστά για το ορώδες καρκίνωμα είναι: 76% στάδιο I, 56% στάδιο II και 25% στάδιο III).

Η θεραπεία των οριακής κακοηθείας ορώδων ωοθηκικών νεοπλασμάτων είναι βασικά χειρουργική με ολική υστερεκτομή και αφαίρεση των εξαρτημάτων. Σε νέες άτεκνες γυναίκες μπορεί να γίνει αφαίρεση μόνον του εξαρτήματος με τη νόσο και μετά την τεκνοποίηση να ολοκληρωθεί η θεραπεία. Κατά την επέμβαση γίνεται λεπτομερής έλεγχος για την παρουσία εμφυτεύσεων ή άλλων εντοπίσεων και την ακριβή σταδιοποίηση της ασθενούς. Όλες οι εμφυτεύσεις πρέπει να αφαιρούνται. Συμπληρωματική θεραπεία (χημειοθεραπεία) συνιστάται να γίνεται σε ασθενείς με διηθητικές εμφυτεύσεις ή παρουσία υπολειμματικής νόσου [17,20].

3Α3. ΟΡΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

ΟΡΩΔΕΣ ΨΑΜΜΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ: Το ορώδες ψαμμοκαρκίνωμα αποτελεί μία ιδιαίτερη κατηγορία (διηθητικού) ορώδους καρκινώματος, το οποίο σε μία μικρή σειρά ασθενών που πρωτοπεριγράφηκε είχε καλύτερη πρόγνωση από αυτό. Τα κριτήρια για τη διάγνωση του περιλαμβάνουν: Μικρή έως μέτρια ατυπία, περιορισμένη συμπαγή ανάπτυξη (< 15 κύτταρα), ψαμμώδη σωμάτια σε 75% τουλάχιστον των θηλών και διήθηση του υποκειμένου στρώματος [132,143].

ΟΡΩΔΕΣ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ: Το ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών αποτελεί το 30-35% των κακοήθων ωοθηκικών νεοπλασμάτων. Η μέση ηλικία των ασθενών με ορώδες καρκίνωμα είναι τα 56 έτη. Έχει αμφοτερόπλευρη εντόπιση στο 75% των περιπτώσεων αλλά μόνον στο 25-30% των περιπτώσεων αντιστοιχεί σε σταδίου I. Μακροσκοπικά το ορώδες (κυστ)αδενοκαρκίνωμα είναι όγκος με κυστικές και συμπαγείς περιοχές με ή χωρίς εξωφυτική ανάπτυξη στην επιφάνεια της ωοθήκης. Μικροσκοπικά τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσονται κατά θηλές, αδενικούς σχηματισμούς ή συμπαγείς δομές. Τυπικά, στα τελευταία, ανευρίσκονται σχισμοειδείς χώροι. Συχνά ανευρίσκονται ψαμμώδη σωμάτια. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν

ποικίλου βαθμού ατυπία συχνά με σημαντική πολυμορφία (γιγαντιαίοι, υπερχρωματικοί πυρήνες, έντονη μιτωτική δραστηριότητα, συχνά με ανώμαλες μιτώσεις). Για τον καθορισμό του βαθμού κακοηθείας στα ωοθηκικά καρκινώματα (grading) έχουν προταθεί διάφορα συστήματα, χωρίς επίσημα να προκρίνεται κάποιο από αυτά [144]. Το σύστημα της FIGO βασίζεται στην αρχιτεκτονική του όγκου: Τα καρκινώματα που εμφανίζουν συμπαγή ανάπτυξη επί εκτάσεως < από 5% θεωρούνται ότι είναι βαθμού κακοηθείας 1, τα καρκινώματα με συμπαγή ανάπτυξη >5 έως 50% είναι βαθμού κακοηθείας 2 ενώ τα καρκινώματα που έχουν συμπαγή ανάπτυξη σε > 50% της εκτάσεως τους είναι βαθμού κακοηθείας 3. Το σύστημα που αναπτύχθηκε από τον Silverberg και τους συνεργάτες του έχει στηριχθεί στο σύστημα Nottingham για την βαθμοποίηση του καρκινώματος του μαστού: καθορίζεται δηλαδή από 1-3 τρεις παραμέτρους: α. Την αρχιτεκτονική του όγκου (1=αδενική, 2=θηλώδης, 3=συμπαγής), β. την ατυπία (1=ελαφρά, 2=μέτρια, 3=έντονη) και γ. την μιτωτική δραστηριότητα (μιτώσεις/HPF) (1=0-9, 2=10-24, 3 >25). Τα νεοπλάσματα που συγκεντρώνουν 3-5 βαθμούς είναι βαθμού κακοηθείας 1, 6 ή 7 βαθμούς είναι βαθμού κακοηθείας 2 και 8 ή 9 βαθμούς είναι βαθμού κακοηθείας 3. Αυτό το σύστημα καθορισμού του βαθμού κακοηθείας των ωοθηκικών καρκινωμάτων δίνει στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην επιβίωση των ασθενών σε όλους τους υπότυπους καρκινωμάτων εκτός από το διαυγοκυτταρικό. Το ορώδες καρκίνωμα αναπτύσσεται κυρίως ενδοκοιλιακά με εξωκοιλιακές ή παρεγχυματικές ηπατικές εντοπίσεις στο 40% των ασθενών. Το 44% των ασθενών εμφανίζει ενδοθωρακική νόσο με πλευριτικές συλλογές. Το καρκίνωμα ωοθηκών έρχεται δεύτερο από άποψη συχνότητας μετά το καρκίνωμα του μαστού στην αιτιολογία κακοήθους πλευριτικής συλλογής. Οι ασθενείς με νόσο σταδίου IV έχουν μέση επιβίωση 9 μήνες.

3B. ΒΛΕΝΝΩΔΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Τα βλεννώδη νεοπλάσματα αποτελούν το 12-15% όλων των νεοπλασμάτων των ωοθηκών. Στην κατηγορία αυτή το 75% είναι καλοήγη, το

10% οριακής κακοηθείας και το 15% κακοήθη. Μερικά τουλάχιστον από τα βλεννώδη νεοπλάσματα φαίνεται ότι δεν ανήκουν στην κατηγορία των κοινών επιθηλιακών όγκων αλλά εμφανίζονται στα πλαίσια τερατώματος. Το 5% των βλεννώδων νεοπλασμάτων αναπτύσσονται σε συνδυασμό με ώριμο κυστικό τεράτωμα [129,130,132,147].

3B1. ΒΛΕΝΝΩΔΕΣ ΚΥΣΤΑΔΕΝΩΜΑ

Το βλεννώδες κυσταδένωμα αποτελεί το 20% των καλοήθων νεοπλασμάτων των ωοθηκών και παρατηρείται συνήθως σε γυναίκες ηλικίας 30-50 ετών. Κατά κανόνα έχει ετερόπλευρη εντόπιση και μπορεί να φθάσει σε μεγάλο μέγεθος. Μακροσκοπικά είναι κυστικό, μονόχωρο ή πολύχωρο με ομαλή εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια. Μικροσκοπικά το επιθήλιο που επενδύει τους κυστικούς χώρους είναι βλεννώδες, ενδοτραχηλικού τύπου.[82]

3B2. ΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΒΛΕΝΝΩΔΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΒΛΕΝΝΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Τα οριακής κακοηθείας βλεννώδη νεοπλάσματα διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: 1. **Εντερικού** τύπου (85-95%) και 2. **Ενδοτραχηλικού** τύπου (5-15%).

ι) ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΒΛΕΝΝΩΔΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρούνται σε γυναίκες μέσης ηλικίας 46 ετών. Είναι κατά κανόνα(σε ποσοστό 99%) ετερόπλευρα. Σπάνια αναπτύσσονται και στις δύο ωοθήκες. Στις περιπτώσεις με αμφοτερόπλευρη εντόπιση (γεγονός που ισχύει και για το βλεννώδες καρκίνωμα) η διαφορική διάγνωση θα πρέπει πάντοτε να περιλαμβάνει το μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα κυρίως από τον γαστρεντερικό σωλήνα (το παχύ έντερο, τον στόμαχο, το πάγκρεας και τα χοληφόρα). Τα νεοπλάσματα αυτά συχνά συνοδεύονται από ενδοκρινικές εκδηλώσεις λόγω της παραγωγής στεροειδών ορμονών από το ωοθηκικό στρώμα που είναι σε άμεση σχέση με τον όγκο. Μακροσκοπικά είναι συνήθως ευμεγέθεις

πολύχωροι κυστικοί όγκοι μέσης διαμέτρου 19 εκ. Το επιθήλιο που επενδύει τους κυστικούς χώρους είναι κυλινδρικό, βλεννώδους τύπου με ποικίλλου βαθμού ατυπία, η οποία ποικίλλει από περιοχή σε περιοχή μέσα στον ίδιο όγκο. Η εκτεταμένη δειγματοληψία (1-2 τομές/εκ. διαμέτρου του όγκου) είναι επιβεβλημένη. Μερικά βλεννώδη νεοπλάσματα εμφανίζουν στο τοίχωμα τους την ανάπτυξη ενός συμπαγούς ογκιδίου, το οποίο ιστολογικά μπορεί να αφορά σε αναπλαστικό καρκίνωμα, σάρκωμα ή σαρκωματοειδή (πιθανόν αντιδραστική) αλλοίωση. Η κατανομή των οριακής κακοηθείας βλεννωδών νεοπλασμάτων ανά στάδιο έχει ως εξής: στάδιο I: 82%, στάδιο II: 6%, στάδιο III:10%, στάδιο IV: 2%. Τα οριακής κακοηθείας βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα αποτελούν μία ετερογενή ομάδα όγκων: τα κριτήρια αυτά στην ταξινόμηση της ΠΟΥ περιελάμβαναν την υπερπλασία /ατυπία του επιθηλίου και την απουσία στρωματικής διηθήσεως. Τα αρχικά κριτήρια της ΠΟΥ διευρύνθηκαν μετά τη διατύπωση τους από τους Hart & Norris οι οποίοι όρισαν ως καρκίνωμα (μη διηθητικό) το νεόπλασμα στο οποίο το βλεννώδες επιθήλιο είχε στιβάδωση > 4 στοίχων και σημαντική ατυπία. Αν και τα κριτήρια αυτά έτυχαν σχετικά ευρείας αποδοχής άρχισαν τελευταία να αμφισβητούνται δεδομένου ότι τα βλεννώδη «καρκινώματα» (μη διηθητικά), σταδίου Ia έχουν εξαιρετική πρόγνωση [63,130,132]. Πρόσφατα προτάθηκε η ταξινόμηση των βλεννωδών νεοπλασμάτων σε 3 κατηγορίες:

α) Οριακής κακοηθείας βλεννώδη νεοπλάσματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από στιβάδωση και ελαφρά επιθηλιακή ατυπία

β) οριακής κακοηθείας βλεννώδη νεοπλάσματα με ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα. Τα νεοπλάσματα αυτά χαρακτηρίζονται από μέτρια ή έντονη πυρηνική ατυπία ή στιβάδωση > 4 στοίχων κυττάρων, ή παρουσία ηθμοειδούς ή θηλωματώδους (χωρίς συνδετικούς άξονες) ανάπτυξης του επιθηλίου

γ) Καρκινώματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από διήθηση του στρώματος. Η διήθηση του στρώματος διακρίνεται σε 1) Διεισδυτική (Infiltrative), που χαρακτηρίζεται από τυχαία ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων μεμονωμένων ή σε αθροίσεις ή κατά αδενικούς σχηματισμούς, μέσα στο στρώμα. Το στρώμα μπορεί να εμφανίζει αντιδραστική ίνωση. Εάν η διήθηση

αντιστοιχεί σε > 1 εστίες εκτάσεως < 10 χιλ.², το καρκίνωμα ορίζεται ως μικροδιηθητικό. 2) Επεκτατική (Expansile), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία συρρεόντων σύνθετων κυσταδενικών σχηματισμών ή θηλών που επενδύονται/καλύπτονται από κακήθες επιθήλιο με παρεμβολή μεταξύ τους ελαχίστου ή και καθόλου στρώματος. Όπως και στα οριακής κακοηθείας ορώδη νεοπλάσματα έτσι και στα βλεννώδη, η παρουσία μικροδιηθήσεως του στρώματος δεν αλλάζει (δεν επιβαρύνει) την πρόγνωση.

Χρησιμοποιώντας αυτή τη ταξινόμηση στο σύνολο των βλεννωδών νεοπλασμάτων από μία σειρά 196 περιστατικών στη βιβλιογραφία, τα 38% ήταν οριακής κακοηθείας, τα 46% ήταν οριακής κακοηθείας με ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα, τα 4% ήταν οριακής κακοηθείας με μικροδιήθηση ενώ τα 12% ήταν καρκινώματα. Τα νεοπλάσματα και των τριών κατηγοριών, όπως περιγράφονται ανωτέρω, όταν είναι σταδίου I είναι σχεδόν πάντα ετερόπλευρα. Η πιθανότητα υποτροπής στα οριακής κακοηθείας βλεννώδη νεοπλάσματα είναι ελάχιστη. Στα βλεννώδη νεοπλάσματα οριακής κακοηθείας με ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα (σταδίου I) η πιθανότητα υποτροπής είναι περίπου 6%, ενώ στα βλεννώδη καρκινώματα (σταδίου I) είναι 11,5%. Ο κίνδυνος υποτροπής μπορεί να αυξηθεί στα βλεννώδη ωοθηκικά νεοπλάσματα σταδίου I όταν υπάρχει ο συνδυασμός διεισδυτικού τύπου ανάπτυξης, χαμηλής διαφοροποίησης πυρήνων και ρήξης του όγκου. Η παρουσία αναπλαστικού στοιχείου σε βλεννώδη καρκινώματα σταδίου Ia (χωρίς ρήξη) δεν επιβαρύνει την πρόγνωση [130,132,148].

Η διετής επιβίωση των οριακής κακοηθείας βλεννωδών νεοπλασμάτων σταδίου I είναι 100%, στα σταδίου II είναι 90-100% και στα σταδίου III 50%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το βλεννώδες καρκίνωμα είναι: στάδιο I 90-83%, στάδιο II 55%, στάδιο III 11-21% και στάδιο IV 9%.

Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι ένα μικρό ποσοστό (12%) των οριακής κακοηθείας βλεννωδών νεοπλασμάτων συνοδεύεται από «ψευδομύξωμα περιτοναίου». Ο όρος αυτός κλινικά χαρακτηρίζει την κατάσταση όπου υπάρχει κοιλιακή διάταση από ασκίτη με βλεννώδες περιεχόμενο. Παθολογοανατομικά το ψευδομύξωμα περιτοναίου είναι ετερογενές διότι με

αυτόν τον όρο έχουν περιγραφεί αλλοιώσεις που χαρακτηρίζονται από άφθονη βλέννη με ή χωρίς επιθηλιακά κύτταρα, η ποσότητα των οποίων ποικίλει (από ελάχιστα έως άφθονα), και τα οποία εμφανίζουν ποικίλου βαθμού ατυπία (από βλεννώδη με ελάχιστη ατυπία έως κακοήθη κύτταρα, συχνά με μορφολογία κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου). Ανεξάρτητα του ορισμού, το ψευδομύξωμα περιτοναίου όταν συνυπήρχε με νεόπλασμα των ωοθηκών εθεωρείτο ως ωοθηκικό νεόπλασμα σταδίου II ή III. Κατά τα τελευταία έτη η σύγχρονη ανεύρεση βλεννώδους νεοπλάσματος της σκωληκοειδούς στο 75% των περιπτώσεων ωοθηκικού βλεννώδους κυστικού νεοπλάσματος με ψευδομύξωμα περιτοναίου οδήγησε στην πιο λεπτομερή μελέτη τέτοιων περιστατικών με διάφορες μεθόδους. Η επικρατέστερη άποψη είναι ότι πρόκειται συνήθως για καρκινώματα σκωληκοειδούς ή υπολοίπου παχέος εντέρου, που εμφανίζουν διασπορά στην περιτοναϊκή κοιλότητα και στις ωοθήκες. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά για τη διαφορική διάγνωση των κακοήθων βλεννώδων ωοθηκικών όγκων όπως διαμορφώνονται στη βιβλιογραφία είναι τα εξής:

Στην περίπτωση όγκων με μορφολογία καρκινώματος η παρουσία ενός από τα κατωτέρω χαρακτηριστικά είναι έντονα ενδεικτική μεταστατικής νόσου ενώ η παρουσία 2 ή περισσότερων από αυτά είναι διαγνωστική για μεταστατική νόσο:

1. Πρόσφατο ιστορικό ή διεγχειρητική ανεύρεση βλεννώδους καρκινώματος του γαστρεντερικού, του παγκρέατος ή των χοληφόρων
2. Παρεγχυματικές μεταστάσεις στο ήπαρ και/ή μεταστάσεις σε μεσεντέριους λεμφαδένες (εκτός από τις περιπτώσεις όπου υπάρχει εκτεταμένη ενδοκοιλιακή νόσος)
3. Αμφοτερόπλευρη ωοθηκική παρεγχυματική ανάπτυξη
4. Πολλαπλά διακριτά, οζίδια στην (στις) ωοθηκικές εντοπίσεις
5. Αγγειακή διήθηση μέσα στην ωοθήκη
6. Απουσία ανοσοέκφρασης της CK7.

Στην περίπτωση νεοπλασμάτων με μορφολογικά καλόηθες ή οριακής κακοηθείας επιθήλιο ή και τα δύο, με παρουσία διηθητικής (dissecting) βλέννης στην περιτοναϊκή κοιλότητα:

1. Εάν υπάρχει βλεννώδες νεόπλασμα στην σκωληκοειδή, θα πρέπει αυτό να θεωρηθεί ως πρωτοπαθές και οι ωοθηκικές εντοπίσεις ως μεταστατικές
2. Εάν ο ωοθηκικός όγκος είναι αμφοτερόπλευρος ή ετερόπλευρος χωρίς να συνδυάζεται με παρουσία δερμοειδούς κύστης, θα πρέπει να θεωρηθεί ως μεταστατικός εκτός αν μετά την αφαίρεση της σκωληκοειδούς και την πλήρη ιστολογική εξέταση της με συνεχείς τομές, δεν ανευρεθεί βλεννώδες νεόπλασμα
3. Εάν ο ωοθηκικός όγκος είναι ετερόπλευρος και συνδυάζεται με δερμοειδή κύστη και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η σκωληκοειδής έχει νεόπλασμα, θα πρέπει να θεωρηθεί ως πρωτοπαθής
4. Το ωοθηκικό νεόπλασμα θα πρέπει να θεωρηθεί ως πρωτοπαθές εάν η σκωληκοειδής είχε αφαιρεθεί κατά το παρελθόν, δεν είχε μακρο- μικροσκοπική ένδειξη νεοπλάσματος και κατά την αφαίρεση της δεν είχε διαπιστωθεί παρουσία βλέννης στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

ii) ΕΝΔΟΤΡΑΧΗΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρούνται συνήθως σε νέες γυναίκες (μέση ηλικία τα 34 έτη) και, κατά τη διάγνωση, σε σημαντικό ποσοστό έχουν επεκταθεί στην περιτοναϊκή κοιλότητα ή σε λεμφαδένες. Μακροσκοπικά συνήθως είναι μονόχωροι κυστικοί όγκοι συχνά με θηλωματώδεις προσεκβολές στην κυστική επιφάνεια. Μικροσκοπικά έχουν ανάπτυξη που θυμίζει τους οριακής κακοηθείας ορώδεις όγκους αλλά το επιθήλιο που επενδύει τις θηλές μοιάζει με αυτό του ενδοτραχήλου. Συνήθως στις κορυφές των θηλών ανευρίσκονται κύτταρα με άφθονο οξύφιλο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηριστική είναι η ουδετερόφιλη διήθηση των θηλών. Συχνά συνυπάρχει ενδομητρίωση. Η πρόγνωση του νεοπλάσματος είναι πολύ καλή. Στον πίνακα 6 φαίνονται συγκριτικά τα

χαρακτηριστικά των 2 τύπων βλεννωδών νεοπλασμάτων (εντερικού και ενδοτραχηλικού τύπου) όπως αναφέρονται σε δύο σειρές στη βιβλιογραφία (ο αριθμός εντός παρενθέσεως είναι από τη 2η σειρά):

Πίνακας 6: Σύγκριση των χαρακτηριστικών των δύο τύπων βλεννωδών νεοπλασμάτων

	Ενδοτραχηλικού τύπου N=30 (10)	Εντερικού τύπου N=18 (44)
Μέση ηλικία	34 (28,8)	52 (42,5)
Αμφοτερόπλευρο	47% (20%)	6% (6,8%)
Διάμετρος	8εκ. (10)	19εκ. (18,1)
Ενδομητρίωση	20% (0%)	0% (0%)
Εμφυτεύσεις/λεμφαδένες	20% (0/5)	0%
Ψευδομύξωμα	0%	17% (2/26)
Κατάληξη από τη νόσο	0% (0%)	14% (1/44)

Rutgers & Scully Cancer 61:340-348, 1988 (S. Siriaunkgul et al Int J Gynecol Pathol 14:198-208, 1995)

3Γ. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΕΙΔΕΙΣ ΟΓΚΟΙ

Οι ενδομητριοειδείς όγκοι της ωοθήκης περιλαμβάνουν νεοπλάσματα που χαρακτηριστικά αναπτύσσονται στο ενδομήτριο δηλ. το ενδομητριοειδές καρκίνωμα, το στρωματικό σάρκωμα, το αδενοσάρκωμα και τον κακοήγη μικτό Μυλλέριο όγκο. Τα επιθηλιακά ενδομητριοειδή νεοπλάσματα αποτελούν το 2-4% των νεοπλασμάτων των ωοθηκών. Διακρίνονται σε καλοήγη, οριακής κακοηθείας (τα δύο αυτά συνήθως με αδено-ινωματώδη υφή) και σε καρκινώματα, που είναι και τα περισσότερα κι αποτελούν το 10-20% των νεοπλασμάτων των ωοθηκών. Η διάκριση των οριακής κακοηθείας νεοπλασμάτων από τα καρκινώματα και σε αυτήν την κατηγορία ωοθηκικών νεοπλασμάτων γίνεται από την παρουσία στρωματικής διηθήσεως στην περίπτωση των καρκινωμάτων. Η παρουσία διηθήσεως είναι δύσκολο να

αξιολογηθεί διότι τα περισσότερα οριακής κακοηθείας ενδομητριοειδή νεοπλάσματα έχουν ινωτικό στρώμα (αδενοϊνώματα). Η συρρέουσα ανάπτυξη αδενίων με πολύπλοκα διακλαδιζόμενη υφή ή η τυχαία διηθητική ανάπτυξη μέσα στο στρώμα θεωρούνται στοιχεία ενδεικτικά διηθήσεως [95,132,150].

Τα ενδομητριοειδή αδενοϊνώματα και κυσταδενώματα είναι πολύ σπάνια και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενδομητριοειδούς (ψευδοπολύστοιβου, μη κροσσώτου) επιθηλίου.

Τα οριακής κακοηθείας ενδομητριοειδή νεοπλάσματα είναι σπάνια (με 125 περίπου περιστατικά στη βιβλιογραφία). Μικροσκοπικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία σύνθετων συρρεόντων αδενίων με ατυπία (έως βαθμού 2). Εάν υπάρχει έντονη πυρηνική ατυπία (βαθμού 3) ή διήθηση του στρώματος διαμέτρου < 5 χιλ. η αλλοίωση χαρακτηρίζεται ως οριακής κακοηθείας με ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα ή με μικροδιήθηση του στρώματος, αντίστοιχα. Σε μία ανασκόπηση 106 τέτοιων νεοπλασμάτων (ορ. κακοηθείας ενδομητριοειδών) στην βιβλιογραφία όλες οι ασθενείς ήταν σταδίου I και το 99% αυτών δεν εμφάνισε υποτροπή [151].

Το ενδομητριοειδές καρκίνωμα συνοδεύεται από ενδομητρίωση στο 20-38% των ασθενών. Αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι το καρκίνωμα αυτό αναπτύσσεται από εστίες ενδομητρίωσης είναι πολύ πιθανόν να αναπτύσσεται και από το επιφανειακό επιθήλιο της ωοθήκης. Στο 10-15% των ασθενών συνυπάρχει ενδομητριοειδές αδenoκαρκίνωμα του ενδομητρίου. Μακροσκοπικά το ενδομητριοειδές καρκίνωμα είναι συμπαγές με μαλακή, εύθρυπτη υφή ή κυστικό με συμπαγείς περιοχές που προβάλλουν στον κυστικό αυλό. Μικροσκοπικά έχει την υφή του ενδομητριοειδούς καρκινώματος του ενδομητρίου με θηλοαδενωματώδη ανάπτυξη, ποικίλλου βαθμού διαφοροποίηση (1-3) και παρουσία πλακώδους μετάπλασης. Κατά τη διάγνωση το 31% είναι σταδίου I, το 20% σταδίου II, το 38% σταδίου III και το 11% σταδίου IV. Η διετής επιβίωση αντίστοιχα είναι 78% (στάδιο I), 63% (στάδιο II), 24% (στάδιο III) και 6% (στάδιο IV). Στις περιπτώσεις που συνυπάρχουν ενδομητριοειδή καρκινώματα στην ωοθήκη και στο ενδομήτριο

τα στοιχεία τα οποία συνηγορούν υπέρ πρωτοπαθούς ωοθηκικού όγκου είναι τα εξής:

1. Μεγάλος ο ωοθηκικός όγκος - μικρός ο ενδομητρικός
2. Παρουσία ενδομητρίωσης στην ωοθήκη
3. Εντόπιση στο ωοθηκικό παρέγχυμα
4. Κατά συνέχεια νεοπλασματική επέκταση από την ωοθήκη προς το έξω, κυρίως τμήμα του μυομητρίου
5. Εμφυτεύσεις αλλού με τυπική υφή ωοθηκικού καρκινώματος
6. Ετερόπλευρος ο όγκος στην ωοθήκη (80-90% των περιπτώσεων) με σχηματισμό μονήρους μάζας
7. Απουσία άτυπης ενδομητρικής υπερπλασίας
8. Ανευπλοειδία με παρεμφερείς δείκτες DNA ή διπλοειδία και στους δύο όγκους (θα πρέπει όμως να λαμβάνεται υπ'όψιν το ενδεχόμενο να είναι οι όγκοι ετερογενείς)
9. Παρόμοιες μοριακές γενετικές ή καρυοτυπικές ανωμαλίες και στους δύο όγκους.

3Δ. ΔΙΑΥΓΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Τα διαυγοκυτταρικά νεοπλάσματα διακρίνονται σε καλοήγη που είναι σπάνια, οριακής κακοηθείας που αποτελούν το 1% των οριακής κακοηθείας νεοπλασμάτων των ωοθηκών και σε καρκινώματα που αντιστοιχούν στο 6% των κοινών επιθηλιακών όγκων. Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα μπορεί να συνδυάζονται με ενδομητρίωση (των ωοθηκών ή της πυέλου) και να έχουν ως παρανεοπλασματική εκδήλωση την υπερασβεστιαμία ή να συνοδεύονται από θρομβοεμβολικά επεισόδια. Μακροσκοπικά το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα είναι κατά κανόνα ετερόπλευρο, συμπαγές ή κυστικό με συμπαγή μάζα να προβάλλει στον κυστικό αυλό. Μικροσκοπικά έχει την ίδια υφή με το αντίστοιχο νεόπλασμα της μήτρας. Χαρακτηρίζεται δηλ. από διαυγή (PAS(+), PAS διάσταση (-)) ή hobnail κύτταρα, ενίοτε και από οξύφιλα κύτταρα, που αναπτύσσονται κατά αδενικούς σχηματισμούς, θηλές ή συμπαγείς αθροίσεις.

Χαρακτηριστικά οι θηλές εμφανίζουν υαλινοποιημένο στρώμα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα συχνά περιέχουν υαλοειδή σφαιρίδια [132,151,152].

Το 43% των διαυγοκυτταρικών καρκινωμάτων είναι σταδίου I, το 19% είναι σταδίου II, το 29% είναι σταδίου III και το 9% είναι σταδίου IV. Η 5ετής επιβίωση είναι 69% για ασθενείς σταδίου I, 55% για εκείνους σταδίου II, 14% για σταδίου III και 4% για σταδίου IV.

3Ε. ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΜΕ ΜΕΤΑΒΑΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟ

3Ε1. ΚΑΛΟΗΘΗ (ΟΓΚΟΣ BRENNER)

Ο όγκος Brenner αποτελεί το 1-2% των επιθηλιακών νεοπλασμάτων και 4-5% των καλοηθών κοινών επιθηλιακών όγκων. Συνήθως παρατηρείται σε γυναίκες ηλικίας 40-60 ετών. Είναι σπάνια (7%) αμφοτερόπλευρος. Ενίοτε συνοδεύεται από ενδοκρινικές εκδηλώσεις λόγω εκκρίσεως στεροειδών ορμονών από τα στρωματικά κύτταρα. Μακροσκοπικά ο όγκος Brenner είναι συνήθως μικρός, περίγραπτος, με σκληρή λευκοκίτρινη επιφάνεια διατομής. Στο 25% των περιπτώσεων συνδυάζεται με βλεννώδες νεόπλασμα κατά κανόνα καλοήθες. Μικροσκοπικά χαρακτηρίζεται από ινώδες στρώμα μέσα στο οποίο ανευρίσκονται νησίδες μεταβατικού επιθηλίου. Κεντρικά συνήθως αναγνωρίζεται κοιλότητα που επενδύεται από βλεννώδη ή ορώδη κύτταρα και περιέχει ηωσινόφιλο υλικό [63].

3Ε2. ΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΟΓΚΟΣ BRENNER

Ο οριακής κακοηθείας όγκος Brenner αποτελεί το 3-5% των όγκων Brenner. Έχει ετερόπλευρη εντόπιση και μακροσκοπικά είναι συμπαγής και κυστικός. Μικροσκοπικά το συμπαγές τμήμα του όγκου έχει την υφή όγκου Brenner με υπερπλαστικό επιθήλιο ενώ το κυστικό επενδύεται από θηλώδες εκ μεταβατικού τύπου επιθήλιο που θυμίζει το ουροθηλιακό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας 1 ή 2/3, οπότε το νεόπλασμα ονομάζεται οριακής κακοηθείας Brenner με ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα. Διήθηση του στρώματος δεν παρατηρείται.

3Ε3. ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΟΓΚΟΣ BRENNER

Αποτελεί το 5% των όγκων Brenner. Στο 12% των περιπτώσεων είναι αμφοτερόπλευρος. Μακροσκοπικά είναι συμπαγής και κυστικός όγκος με θηλωματώδεις ή συμπαγείς προσεκβολές που προβάλλουν στους κυστικούς χώρους. Συχνά παρατηρούνται αποτιτανώσεις. Εξω-ωοθηκικές εντοπίσεις ανευρίσκονται στο 20% των ασθενών. Μικροσκοπικά χαρακτηρίζεται από διήθηση του στρώματος ενώ ενθυμίζει ουροθηλιακό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας 2, ή επιδερμοειδές καρκίνωμα. Συνυπάρχουν στοιχεία όγκου Brenner καλοήθους ή οριακής κακοηθείας.

3Ε4. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΚ ΜΕΤΑΒΑΤΙΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ

Αποτελεί το 1% των κοινών επιθηλιακών όγκων όταν είναι σε αμιγή μορφή. Μπορεί όμως να αποτελεί έλασσον ή μείζον στοιχείο στα πλαίσια άλλων κοινών επιθηλιακών όγκων. Είναι αμφοτερόπλευρο στο 15% των περιπτώσεων. Κατά τη διάγνωση το 70% των καρκινωμάτων εκ μεταβατικού επιθηλίου εμφανίζουν εξω-ωοθηκική εντόπιση. Μακροσκοπικά μοιάζουν με τις άλλες κατηγορίες κοινών επιθηλιακών καρκινωμάτων. Μικροσκοπικά έχει την υφή ουροθηλιακού καρκινώματος βαθμού κακοηθείας 2 ή 3. Σε αντίθεση με τον κακοήγη όγκο Brenner στοιχεία καλοήθους ή οριακής κακοηθείας όγκου Brenner δεν παρατηρούνται. Η διετής επιβίωση ασθενών σταδίου Ια είναι 43%.

3ΣΤ. ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΕΚ ΠΛΑΚΩΔΟΥΣ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ

3ΣΤ1. ΕΠΙΔΕΡΜΟΕΙΔΗΣ ΚΥΣΤΗ

Αναπτύσσεται συνήθως στην μελώδη μοίρα της ωοθήκης και επενδύεται από κερατινοποιούμενο πλακώδες επιθήλιο χωρίς άλλα στοιχεία.

3ΣΤ2. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΚ ΠΛΑΚΩΔΟΥΣ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ

Είναι σπάνιος όγκος που αναπτύσσεται συνήθως επί εδάφους τερατώματος. Σε πολύ λίγες περιπτώσεις αναπτύσσεται επί εδάφους όγκου Brenner, ενδομητριώσεως ή αμιγώς. Οι τελευταίες αυτές περιπτώσεις ανήκουν

στην κατηγορία των κοινών επιθηλιακών όγκων. Το αμιγές καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου αναπτύσσεται σε γυναίκες μέσης ηλικίας 56 ετών. Οι περισσότερες περιπτώσεις κατά τη διάγνωση είναι σταδίου II και III. Μακροσκοπικά είναι συνήθως συμπαγείς όγκοι με περιοχές νεκρώσεως και κυστικής εκφυλίσεως. Μικροσκοπικά η υφή είναι κυστική (με κεντρική νέκρωση), συμπαγής (νησιδιακή), διάχυτα διηθητική ή σαρκωματοειδής. Η πρόγνωση είναι κακή [132,153].

3Ζ. ΜΙΚΤΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Τα μικτά επιθηλιακά νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία 1 ή περισσότερων επιθηλιακών τύπων σε ένα κοινό επιθηλιακό όγκο. Για να τοποθετηθεί ένα νεόπλασμα στη μικτή κατηγορία θα πρέπει οι διάφοροι επιθηλιακοί τύποι να είναι μακροσκοπικά αναγνωρίσιμοι ή μικροσκοπικά να αποτελούν το 10% τουλάχιστον του όγκου. Οι συνηθέστεροι συνδυασμοί είναι: Ογκος Brenner και βλεννώδες νεόπλασμα, ενδομητριοειδές καρκίνωμα και διαυγοκυτταρικό, καρκίνωμα εκ μεταβατικού επιθηλίου με ορώδες θηλώδες καρκίνωμα, ενδομητριοειδές καρκίνωμα με ορώδες θηλώδες ή αδιαφοροποίητο καρκίνωμα.

3Η. ΑΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΤΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Αποτελεί το 5% των ωοθηκικών καρκινωμάτων. Το 20% είναι αμφοτερόπλευρα. Κατά τη διάγνωση είναι συνήθως σταδίου III και IV και έχουν κακή πρόγνωση.

4.ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΩΟΘΗΚΩΝ

Στον καρκίνο των ωοθηκών έχει επικρατήσει το σύστημα σταδιοποίησης της FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) [1,81,133].

Στάδιο I: όγκος που περιορίζεται στις ωοθήκες (στη μία ή και στις δύο)

IA: προσβάλεται η μία ωοθήκη, παρουσία ακέραιης κάψας, (-) κακοήθη κύτταρα σε ασκитικό υγρό ή έκπλυμα της περιτοναϊκής κοιλότητας, χωρίς ανάπτυξη στην επιφάνεια της ωοθήκης

IB: όπως το IA αλλά με αμφοτερόπλευρη εντόπιση

IC: Μία ή δύο ωοθήκες με όγκο και με ένα από τα ακόλουθα: ρήξη της κάψας, ανάπτυξη στην επιφάνεια της ωοθήκης, κακοήθη κύτταρα στο ασκитικό υγρό ή σε έκπλυμα της περιτοναϊκής κοιλότητας.

Στάδιο II: όγκος σε μία ή και στις δύο ωοθήκες με επέκταση στην πύελο

IIA: επέκταση ή/και εμφυτεύσεις στην μήτρα ή/και σάλπιγγες, χωρίς κακοήθη κύτταρα σε ασκитικό υγρό ή περιτοναϊκό έκπλυμα

IIB: Επέκταση σε άλλους ιστούς της πυέλου. Χωρίς κακοήθη κύτταρα σε ασκитικό υγρό ή έκπλυμα της περιτοναϊκής κοιλότητας

IIC: Όπως το IIA ή IIB αλλά και με κακοήθη κύτταρα σε ασκитικό υγρό ή σε έκπλυμα της περιτοναϊκής κοιλότητας

Στάδιο III: όγκος στη μία ή και στις δύο ωοθήκες με μικροσκοπικά επιβεβαιωμένες περιτοναϊκές μεταστάσεις πέρα από την πύελο, και/ή με μεταστάσεις σε επιχώριους λεμφαδένες

IIIA: Μικροσκοπική περιτοναϊκή μετάσταση έξω από την πύελο

IIIB: Μακροσκοπική (< 2εκ) περιτοναϊκή μετάσταση έξω από την πύελο

IIIC: Μακροσκοπική (> 2εκ) περιτοναϊκή μετάσταση έξω από την πύελο ή/και μεταστάσεις σε επιχώριους λεμφαδένες

Στάδιο IV: Απομακρυσμένες μεταστάσεις (εκτός από περιτοναϊκές)

5.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ - ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

α) Η θεωρία της ωοθυλακιορρηξίας

Διατυπώθηκε από τον Fathalla το 1972. Με βάση αυτήν, ο τραυματισμός του επιθηλίου που συνεπάγεται η ωοθυλακιορρηξία (ΩΘΡ) και οι διαδικασίες επούλωσης που ακολουθούν, ευνοούν τη δημιουργία των προϋποθέσεων για την δράση των μηχανισμών καρκινογένεσης και την ανάπτυξη μεταλλάξεων. Η ΩΘΡ σχετίζεται επίσης με το σχηματισμό

κυτταρικών εγκλείστων τα οποία με τη μορφή μικρών κύστεων ανευρίσκονται υποεπιθηλιακά, στο στρώμα της ωοθήκης. Το επιθήλιο των κύστεων αυτών μπορεί να υποστεί μετάπλαση και ακολούθως να παρουσιάσει δυσπλασία και καρκίνο. Θεωρείται ότι οι παράγοντες που ελαττώνουν ή αυξάνουν τον αριθμό των ΩΘΡ στη διάρκεια της ζωής της γυναίκας (π.χ κυήσεις και αντισυλληπτικό δισκίο (ΑΔ) ή καθυστερημένη εμμηνόπαυση αντίστοιχα), επιδρούν αρνητικά ή θετικά στον κίνδυνο ανάπτυξης επιθηλιακών νεοπλασμάτων ωοθήκης [131].

β) Θεωρία των γοναδοτροφινών

Μελέτες σε πειραματόζωα και επιδημιολογικές παρατηρήσεις υποστηρίζουν την άποψη ότι η μεγάλη αύξηση των γοναδοτροφινών στην κυκλοφορία, ευνοεί τη δημιουργία μεταλλάξεων στο επιθήλιο της ωοθήκης. Οι υποστηρικτές της θεωρίας αυτής αποδίδουν την προστατευτική επίδραση των ανδρογόνων στην ελάττωση παραγωγής γοναδοτροφινών, την οποία προκαλεί η χορήγηση τους [131].

γ) Θεωρία των στεροειδών ορμονών

Η παρουσία υποδοχέων των ανδρογόνων, οιστρογόνων και προγεστερόνης στο επιθήλιο της ωοθήκης και μια ποικιλία επιδημιολογικών παρατηρήσεων, οδήγησε ορισμένους ερευνητές στην υπόθεση ότι η δράση των στεροειδών αυτών μπορεί να αυξάνει (ανδρογόνα) ή να ελαττώνει (προγεστερόνη) τον κίνδυνο ανάπτυξης επιθηλιακών καρκίνων ωοθήκης. Γυναίκες που έλαβαν αντισύλληψη με προγεστερόνη μόνο, παρουσίασαν σχετικό κίνδυνο (RR) για ανάπτυξη καρκινώματος των ωοθηκών 0,39, για χρήση μέχρι 3 χρόνια και 0,21 για χρήση σε μεγαλύτερο διάστημα. Επειδή τα αντισυλληπτικά αυτά δεν αναστέλλουν την ΩΘΡ στο 40% περίπου των γυναικών, η προστατευτική τους επίδραση αποδίδεται στη δράση της προγεστερόνης και όχι στην αναστολή της ΩΘΡ [95,131].

Άσχετα από το βαθμό αξιοπιστίας της κάθε μιας από τις παραπάνω θεωρίες, οι σύγχρονες απόψεις για το ρόλο των σημαντικότερων παραγόντων που τροποποιούν τον σχετικό κίνδυνο για την ανάπτυξη του επιθηλιακού καρκίνου ωοθήκης (ΕΚΩ), μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα:

1. Τεκνοποίηση: Η προστατευτική δράση της έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετές μελέτες. Γυναίκες με παιδιά έχουν 45% ελαττωμένο κίνδυνο για τη νόσο, σε σύγκριση με άτεκνες. Κάθε τοκετός υπολογίζεται ότι προσφέρει προστασία κατά 13-19%.

2. Αντισυλληπτικό δισκίο: η χορήγηση του δρα προστατευτικά, ελαττώνοντας το σχετικό κίνδυνο κατά 30-60%. Η διάρκεια λήψης του σχετίζεται επίσης με το βαθμό προστασίας. Η μείωση του κινδύνου υπολογίζεται σε 11% για λήψη επί ένα έτος και φτάνει στο 50% για λήψη επί 5 ή περισσότερα έτη.

3. Ηλικία εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης: Παρ' όλο που έχει αναφερθεί κάποια μικρή προστατευτική επίδραση σε γυναίκες με καθυστερημένη εμμηναρχή, τα δεδομένα που υπάρχουν δεν θεωρούνται ικανά για να τη βεβαιώσουν. Η καθυστερημένη εμμηνόπαυση διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται με μικρή αύξηση του κινδύνου σε ορισμένες Ευρωπαϊκές μελέτες.

4. Η υστερεκτομή με διατήρηση των ωοθηκών σχετίζεται με ελάττωση του κινδύνου κατά 33-36%. Σημαντική επίσης προστασία προσφέρει η απολίνωση των σαλπίγγων. Στην μελέτη Nurse's Health η συχνότητα του καρκίνου των ωοθηκών βρέθηκε μειωμένη κατά 67% στις γυναίκες με απολίνωση των σαλπίγγων.

Αναλυτικά οι παράγοντες που επιδρούν στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ωοθήκης [63] , φαίνονται στον πίνακα 7:

Πίνακας 7: Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρκινώματος της ωοθήκης

I) Αύξηση κινδύνου	II) Ελάττωση κινδύνου
Κληρονομικότητα	Αντισυλληπτικό δισκίο
Καθυστερημένη εμμηνόπαυση	Τεκνοποίηση
Ορμονοθεραπεία υποκατάστασης	Υστερεκτομή
Στείρωση	Απολίνωση σαλπίγγων
	Θηλασμός
	Ακεταμινοφαίνη
	Φενρετινίδη

Μολονότι πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες που σκοπό είχαν την ανάδειξη προκαρκινικών αλλοιώσεων, καμία δεν απέδωσε. Αυτό οδήγησε στην πρόταση πως ο καρκίνος της ωοθήκης αναπτύσσεται *de novo* [123,131]. Κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής 21550 γυναίκες αναπτύσσουν καρκίνο ωοθηκών "*de novo*" και 14600 πεθαίνουν από τη νόσο. Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ο πλέον θανατηφόρος από όλους τους γυναικολογικούς καρκίνους. Είναι ξεκάθαρο πως ο όρος *de novo* αντανακλά την άγνοια μας σχετικά με τα πρώιμα γεγονότα της καρκινογένεσης των ωοθηκών. Υπάρχουν ωστόσο 3 δεδομένα:

1. Παρόλο που είναι γενικά αποδεκτό πως υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαφόρων ιστολογικών τύπων, η μεγάλη πλειοψηφία των ωοθηκικών όγκων είναι υψηλού βαθμού ορώδεις όγκοι και για το λόγο αυτό ο καρκίνος των ωοθηκών θεωρείται ως ξεχωριστή πάθηση.
2. Ο ωοθηκικός καρκίνος προέρχεται από το επιφανειακό ωοθηκικό επιθήλιο (μεσοθήλιο), το οποίο εγκολεάζει προς το υποκείμενο στρώμα δημιουργώντας κύστες οι οποίες υφίστανται κακοήγη εξαλλαγή.
3. Ο ωοθηκικός καρκίνος εκτείνεται από την ωοθήκη έως την πύελο, την κοιλιά και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές.

Βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα, οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου των ωοθηκών όταν είναι ακόμα περιορισμένος στην ωοθήκη, καθώς και στην ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Δυστυχώς αυτές οι προσπάθειες δεν έχουν αποδώσει δεδομένου ότι η επιβίωση των γυναικών με καρκίνο των ωοθηκών δεν έχει αλλάξει τα τελευταία 50 χρόνια. Αυτό εξηγείται με βάση το γεγονός ότι οι θεωρίες της ιστογένεσης πάνω στις οποίες βασίζονται αυτές οι προσπάθειες είναι ελλιπείς.

6. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΩΟΘΗΚΗΣ

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα για την κατανόηση αυτών των όγκων είναι ότι πρόκειται για μια πάθηση η οποία παρουσιάζεται με ένα σύνολο διαφορετικών μορφών με μεγάλες διαφορές στην κλινικο-παθολογοανατομική εικόνα και συμπεριφορά. Βασιζόμενοι σε μια σειρά μορφολογικών και μοριακών γενετικών μελετών, προτάθηκε ένα δυαδικό μοντέλο που κατηγοριοποιεί τους διάφορους τύπους ωοθηκικού καρκίνου σε δυο ομάδες: Τύπου I και Τύπου II [95,132].

Η ομάδα Τύπου I έχει ανώδυνη κλινική εικόνα και συνήθως παρουσιάζεται σε χαμηλό στάδιο. Παρουσιάζει κοινή γενεαλογία με το αντίστοιχο καλοήθες κυστικό νεόπλασμα και εμφανίζεται συνήθως μέσα από ένα ενδιάμεσο στάδιο χαμηλής δυνητικής κακοήθειας (borderline tumor) που υποστηρίζει τη μορφολογική συνέχεια της πορείας της νόσου. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνη μεταξύ αδενώματος και καρκίνου του παχέος εντέρου. Η ομάδα Τύπου I, αποτελείται από τα χαμηλού βαθμού κακοηθείας ορώδη καρκινώματα, τα ενδομητριοειδή, τα διαυγοκυτταρικά, τα βλεννώδη και μεταπλαστικά (Brenner) καρκινώματα.

Αντίθετα από τις ξεκάθαρες μορφολογικές διαφορές των καρκίνων που ανήκουν στην ομάδα Τύπου I, οι μορφολογικές διαφορές αυτών που ανήκουν στην ομάδα Τύπου II είναι λιγότερο εμφανείς γεγονός που δυσχεραίνει την διαφορική τους διάγνωση από τους παθολογοανατόμους.

Η ομάδα Τύπου II εμφανίζεται με θηλοειδή, αδenoειδή και συμπαγή διανόρφωση και διαγιγνώσκεται ως υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδες, ενδομητριοειδές ή αδιαφοροποίητο καρκίνωμα ανάλογα με το κυρίαρχο στοιχείο. Γενικά οι περισσότεροι παθολογοανατόμοι τους κατηγοριοποιούν ως υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδη καρκινώματα ακόμα κι αν παρουσιάζουν ελάχιστη ομοιότητα με το σαλπιγγικού τύπου επιθήλιο (η βάση για να ορίσεις ένα καρκίνωμα ως ορώδες).

Τα καρκινοσαρκώματα (malignant mixed mesodermal tumors), ανήκουν στην ομάδα Τύπου II επειδή παρουσιάζουν επιθηλιακά στοιχεία

όμοια με τους όγκους της ομάδας Τύπου II. Οι όγκοι Τύπου II είναι εξαιρετικά επιθετικοί και σχεδόν πάντα διαγιγνώσκονται σε προχωρημένα στάδια. Αποτελούν περίπου το 75% όλων των επιθηλιακών όγκων της ωοθήκης και έχουν σχετικά πτωχή πρόγνωση. Οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ Τύπου I και Τύπου II αντανακλώνονται και από διαφορές στο μοριακό γενετικό επίπεδο.

Ως ομάδα οι καρκίνοι Τύπου I είναι γενετικά πιο σταθεροί από τους Τύπου II και παρουσιάζουν μεταλλάξεις. Έτσι, οι μεταλλάξεις *KRAS*, *BRAF* και *ERB2* εμφανίζονται στα 2/3 των χαμηλού βαθμού κακοηθείας όγκων ορώδους τύπου, ενώ οι μεταλλάξεις *TP53* είναι σπάνιες σε αυτές τις νεοπλασίες. Το χαμηλού βαθμού κακοηθείας ενδομητριοειδές καρκίνωμα παρουσιάζει αλλοιώσεις στην οδό wnt που αφορά σωματικές μεταλλάξεις των *CTNNB1*, *PTEN* και *PIK3CA* γονιδίων. Ο βλεννώδης τύπος παρουσιάζει μεταλλάξεις στο *KRAS* σε περισσότερο από το 50% των περιστατικών. Ο διαυγοκυτταρικός τύπος έχει υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων του *PIK3CA*. Υπάρχουν λίγα στοιχεία για τους όγκους Brenner. Το ορώδες καρκίνωμα υψηλού βαθμού κακοηθείας χαρακτηρίζεται από πολύ συχνές μεταλλάξεις στο *TP53* (>80% των περιπτώσεων) και στην *κυκλίνη-E1*.

Ανακεφαλαιώνοντας τα νεοπλάσματα Τύπου I είναι γενετικά πιο σταθερά από του Τύπου II και παρουσιάζουν διαφορετικές μεταλλάξεις ανάλογα με τον ιστολογικό υπότυπο. Αντιθέτως, τα νεοπλάσματα Τύπου II δείχνουν μια μεγαλύτερη μορφολογική και μοριακή ομοιογένεια, είναι γενετικώς ασταθή και έχουν πολύ υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων *TP53*. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι διαφορετικοί τύποι καρκίνων των ωοθηκών αναπτύσσονται διαμέσου διαφορετικών μοριακών οδών [95,131].

7.ΘΕΩΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ

Τα κύτταρα από τα οποία προέρχεται ο καρκίνος των ωοθηκών και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο καρκίνος αναπτύσσεται ακόμα ερευνώνται. Η ευρύτερα αποδεκτή άποψη για την ωοθηκική καρκινογένεση υποστηρίζει ότι όλοι οι τύποι καρκίνου της ωοθήκης προέρχονται από το επιφανειακό επιθήλιο

της ωοθήκης (μεσοθήλιο) και οι επικείμενες μεταπλαστικές αλλαγές οδηγούν στην ανάπτυξη των διαφορετικών κυτταρικών τύπων (ορώδες, ενδομητριοειδές, διαυγοκυτταρικό, βλεννώδες, Brenner) οι οποίοι μορφολογικά μοιάζουν με το επιθήλιο των σαλπίνγων, του ενδομητρίου, του γαστρεντερικού σωλήνα ή του ενδοτραχήλου και της ουροδόχου κύστης, αντίστοιχα. Η φυσιολογική ωοθήκη, παρ' όλα αυτά, δεν έχει κανένα μορφολογικό στοιχείο που να μοιάζει με αυτούς τους καρκίνους. Επιπλέον, εμβρυολογικά ο τράχηλος, το ενδομήτριο και οι σάλπιγγες προέρχονται από τους πόρους του Muller, ενώ η ωοθήκη αναπτύσσεται από το διάμεσο μεσόδερμα στην ουρογεννητική ακρολοφία διαχωριζόμενη από τους πόρους του Muller. Συνεπώς, μια εναλλακτική θεωρία προτείνει ότι τα καρκινώματα με Μυλλεριανό φαινότυπο (ορώδη, ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικά) δεν προέρχονται από το μεσοθήλιο αλλά από Μυλλεριανούς ιστούς. Αυτού του είδους οι ιστοί ανευρίσκονται παρασαλπινγικά ή παραωοθηκικά και χαρακτηρίζονται ως δευτερογενές Μυλλεριανό σύστημα [131,132].

Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, οι όγκοι ωοθήκης προέρχονται από αυτά τα έγκλειστα. Καθώς ο όγκος μεγαλώνει, συμπιέζει και πιθανόν εξαλείφει τον ωοθηκικό ιστό με αποτέλεσμα να φαίνεται ως εξαρτηματικός όγκος που προέρχεται από την ωοθήκη. Πρόσφατα, προέκυψε μια άλλη θεωρία που υποστηρίζει πως το μεγαλύτερο μέρος των ωοθηκικών όγκων (υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδεις όγκοι) προέρχεται από υψηλόβαθμο ενδοεπιθηλιακό ορώδες καρκίνωμα στις σάλπιγγες το οποίο κατευθύνεται προς τις ωοθήκες.

Η αξιολόγηση αυτών των θεωριών είναι προβληματική γιατί είναι δύσκολη η πειραματική διαδικασία. Προσφάτως έγινε μια προσπάθεια ενσωμάτωσης των κλινικοπαθολογοανατομικών και μοριακών γενετικών στοιχείων των θεωριών αυτών έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια ενοποιημένη θεωρία για την ωοθηκική καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα:

Η θεωρία της προέλευσης από το επιφανειακό επιθήλιο της ωοθήκης (μεσοθήλιο) παρουσιάζει πολλούς περιορισμούς. Ιστολογικά, το μεσοθήλιο που καλύπτει τις ωοθήκες δεν φέρει καμία ομοιότητα με το ορώδες, ενδομητριοειδές, βλεννώδες, διαυγοκυτταρικό και Brenner καρκίνωμα των

ωοθηκών. Για να αντιμετωπιστούν λοιπόν αυτές οι αντιφάσεις προτάθηκε πως το μεσοθήλιο που καλύπτει τις ωοθήκες εγκολεάζεται από το υποκείμενο στρώμα και σχηματίζει έγκλειστα τα οποία υπό την επίδραση τοπικών παραγόντων, πιθανόν στεροειδών ορμονών, υπόκεινται σε μεταπλαστικές αλλαγές που οδηγούν στη μεταμόρφωση του μεσοθηλίου σε επιθήλιο Μυλλεριανού τύπου. Αυτά τα έγκλειστα με τον καινούριο τους Μυλλεριανό φαινότυπο, μπορούν να υποστούν κακοήγη εξαλλαγή σε καρκίνο διαφόρων κυτταρικών τύπων (ορώδης, ενδομητριοειδής και διαυγοκυτταρικός).

Αν και τέτοιου είδους έγκλειστα (Μυλλεριανού τύπου επιθηλίου) παρατηρούνται συχνά στον ωοθηκικό φλοιό, δε διευκρινίζεται τί μπορεί να θεωρηθεί ως μετάβαση από αυτά. Επιπλέον, έγκλειστα επικαλυμμένα με εντερικού τύπου επιθήλιο που μεταμορφώνονται σε βλεννώδες καρκίνωμα, δεν ανευρίσκονται συχνά. Το ίδιο μπορεί να ειπωθεί για την απουσία μεταβατικού επιθηλίου για την ανάπτυξη όγκων Brenner.

Βασικό μειονέκτημα της Μυλλεριανής θεωρίας είναι ότι πρόδρομες αλλοιώσεις που ενθυμίζουν ορώδες, ενδομητριοειδές και διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα, σπάνια έχουν διαπιστωθεί σε παρασαλπινγικές και παραωοθηκικές κύστεις. Επιπλέον, η πλειοψηφία των βλεννώδων καρκίνων παρουσιάζει εντερικού αντί για ενδοτραχηλικού τύπου βλεννώδη διαφοροποίηση και για αυτό το λόγο τα εν λόγω καρκινώματα δεν εντάσσονται στους Μυλλεριανούς όγκους. Παρόμοιο πρόβλημα υπάρχει και για τους όγκους Brenner που προσομοιάζουν με το ουροθήλιο, που δεν είναι Μυλλεριανής προέλευσης. Τα περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το μεγαλύτερο μέρος αυτών που θεωρούνται πρωτογενείς καρκίνοι ωοθήκης (ορώδης, ενδομητριοειδής, διαυγοκυτταρικός) προέρχονται από τις σάλπιγγες και το ενδομήτριο και όχι από τις ωοθήκες [95,131].

Είναι γεγονός ότι πρόδρομες βλάβες στον καρκίνο των ωοθηκών σε παλαιότερες μελέτες δεν έχουν ανευρεθεί. Μελέτες σε φυσιολογικές ωοθήκες ετερόπλευρα από τις ωοθήκες με καρκίνο (μη κληρονομικό), ποτέ δεν ανέδειξαν μια πειστική πρόδρομη βλάβη. Πρόσφατες, όμως, μελέτες ανέδειξαν έναν αριθμό μορφολογικών αλλοιώσεων σε φαινομενικά φυσιολογικές

ωοθήκες, όπως αυξημένο αριθμό κύστεων που εγκλείουν το υποκείμενο στρώμα καθώς και μικρού βαθμού ατυπίες.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι είχε υποτεθεί πως η προέλευση του καρκίνου των ωοθηκών λογικά βρίσκεται στις ωοθήκες, ο ρόλος των σαλπινγγων δεν είχε αξιολογηθεί προσεκτικά. Μελέτες, όμως, που εστίασαν στις σάλπιγγες επιβεβαίωσαν πως μικρές *in situ* σαλπιγγικές νεοπλασίες εμφανίζονται σε γυναίκες με γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη ωοθηκικού καρκίνου. Αυτό οδήγησε στο να συμπεριληφθεί ο καρκίνος των σαλπινγγων στην ομάδα καρκίνων που συνδέονται με τις κληρονομικές μεταλλάξεις του *BRCA*. Στη συνέχεια προτάθηκε ότι ένα μέρος των ωοθηκικών όγκων μπορεί να είναι το αποτέλεσμα εμφύτευσης κακοήθων κυττάρων από τον σαλπιγγικό όγκο στις ωοθήκες. Το επόμενο βήμα συνέδεε αυτό που θεωρούνταν ως ενδοεπιθηλιακός σαλπιγγικός καρκίνος ή ως ορώδης ενδοεπιθηλιακός σαλπιγγικός καρκίνος με τον καρκίνο των ωοθηκών καθόσον πάνω από το 70% του μη κληρονομικού ωοθηκικού και περιτοναϊκού υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδους καρκινώματος σχετίζονται με βλεννώδες σαλπιγγικής προέλευσης [129,131].

Αυτή η παρατήρηση έδωσε βάση στην πρόταση ότι οι ορώδεις ενδοεπιθηλιακοί σαλπιγγικοί καρκίνοι, που σχεδόν πάντα ανιχνεύονται στον κώδωνα, μπορεί να είναι η πηγή του υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδους καρκινώματος στις γυναίκες με κληρονομικές μεταλλάξεις *BRCA* αλλά και στις γυναίκες χωρίς προδιάθεση για καρκίνο των ωοθηκών. Παρ' όλο που δεν έχει ακόμα ξεκαθαρίσει εάν η σαλπιγγική συμμετοχή μπορεί να αντιστοιχεί σε δευτερογενή εξάπλωση από έναν καρκίνο της ωοθήκης στο ίδιο δείγμα, η παρουσία τοπικών μη συνεχόμενων ενδοεπιθηλιακών βλαβών (ορώδης ενδοεπιθηλιακός σαλπιγγικός καρκίνος) μπορεί να είναι μια ασυνήθιστη έκφραση μεταστάσεων. Επιπλέον, η αναγνώριση ορώδους ενδοεπιθηλιακού σαλπιγγικού καρκίνου σε δείγματα από γυναίκες με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο ωοθήκης, όπου ολοκληρωμένος μικροσκοπικός έλεγχος σε σάλπιγγες και ωοθήκες απέτυχε να εξακριβώσει διηθητικό καρκίνο σε αυτά τα όργανα, ενισχύει την ιδέα ότι οι ορώδεις νεοπλαστικές διεργασίες μπορεί να

ξεκινούν από τις σάλπιγγες παρά από τις ωοθήκες. Περαιτέρω ενίσχυση αυτής της άποψης προκύπτει από το γεγονός ότι σχεδόν όλα τα ορώδη ενδοεπιθηλιακά σαλπιγγικά καρκινώματα υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη P53, όπως ο υψηλόβαθμης κακοήθειας ορώδης καρκίνος της ωοθήκης.

Μελέτες με μικροτομές laser αυτών των βλαβών απέδειξαν ότι παρουσιάζουν μεταλλάξεις του *TP53*. Επιπλέον, το ορώδες ενδοεπιθηλιακό σαλπιγγικό καρκίνωμα με συνυπάρχοντα καρκίνο ωοθήκης μοιράζονται όχι μόνο κοινά μορφολογικά στοιχεία αλλά και τις ίδιες μεταλλάξεις στο *TP53*.

Πρόσθετα αποδεικτικά στοιχεία που ενοχοποιούν τις σάλπιγγες παρά τις ωοθήκες ως την περιοχή προέλευσης του ορώδους καρκίνου προέρχονται από μια μελέτη γονιδίων που δείχνει ότι το προφίλ της έκφρασης γονιδίων του υψηλόβαθμου ορώδους καρκίνου σχετίζεται πολύ περισσότερο με τις σάλπιγγες παρά με την ωοθήκη. Εκτός αυτού, το υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα εκφράζει το PAX8 (Μυλλεριανός δείκτης) και όχι την καλρετινίνη (μεσοθηλιακός δείκτης).

Βασιζόμενοι σε αυτές τις ανακαλύψεις μια αλληλουχία παθογενετικών γεγονότων προτάθηκε ξεκινώντας με τοξικές βλάβες στο DNA, εν συνεχεία μεταλλάξεις του *TP53* και προοδευτική αδυναμία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, το οποίο έπειτα καταλήγει στην ανάπτυξη καρκίνου [63,95,131].

Γενικά μια νεοπλασία πριν αποκτήσει την ικανότητα μετάστασης, πρέπει πρώτα να εισχωρήσει και να βρει πρόσβαση στο φλεβικό δίκτυο ή στο λεμφικό σύστημα. Το κωδονικό άκρο των σαλπίγγων περιέχει πλούσιο λεμφαγγειακό δίκτυο. Επιπλέον, είναι σχεδόν σε άμεση επαφή με τη βασική μεμβράνη του σαλπιγγικού επιθηλίου και για αυτό το λόγο ο καρκίνος των σαλπίγγων ίσως να μη χρειάζεται να λάβει μεγάλο μέγεθος για να εισβάλλει σε αυτό το εξαιρετικά προσβάσιμο λεμφαγγειακό δίκτυο. Εκτός αυτού, η διήθηση στην περίπτωση του ορώδους ενδοεπιθηλιακού σαλπιγγικού καρκίνου ίσως να μην είναι αναγκαία για την εξάπλωση του όγκου. Τα σαλπιγγικά ενδοεπιθηλιακά νεοπλάσματα είναι όμοια μορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά με το ενδοεπιθηλιακό ενδομητριοειδές καρκίνωμα, το οποίο θεωρείται

πρόδρομη ή πρόωρη μορφή του ορώδους καρκινώματος της μήτρας. Αυτές οι βλάβες έχουν επίσης αναγνωρισθεί και ως επιφανειακά ορώδη καρκινώματα της μήτρας. Διαδίδονται διαμέσου της περιτοναϊκής κοιλότητας πιθανόν λόγω της προσπέλασης καρκινικών κυττάρων διαμέσου των σαλπίγγων χωρίς τη διήθηση του μυομητρίου. Τα κύτταρα που αποτελούν το ενδομητριοειδές και το ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα των σαλπίγγων είναι εξαιρετικά αναπλαστικά και όμοια μορφολογικά με τα κύτταρα του ορώδους καρκινώματος υψηλόβαθμης κακοήθειας.

Πιθανότατα, αυτά τα κύτταρα να μπορούν να εμφυτευθούν στην επιφάνεια των ωοθηκών και του περιτοναίου, επί απουσίας διηθητικών φαινομένων στις σάλπιγγες. Την υπόθεση την υποστηρίζουν οι θετικές κυτταρολογικές πλύσεις σε γυναίκες στις οποίες η μόνη αλλοίωση ήταν το ορώδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα των σαλπίγγων. Σε μελέτες ωοθηκικού και πρωτογενούς περιτοναϊκού υψηλόβαθμης κακοήθειας ορώδους καρκίνου, στο 70% των περιπτώσεων διαπιστώθηκε συμμετοχή των σαλπίγγων. Ωστόσο, δημιουργείται ένα ερώτημα για την προέλευση του εναπομείναντος ωοθηκικού καρκίνου στον οποίο απουσιάζουν οι ενδείξεις συμμετοχής των σαλπίγγων. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι υψηλού βαθμού κακοηθείας καρκίνοι παρουσιάζουν μεταλλάξεις *KRAS* όμοιες με εκείνες των ορώδων καρκίνων οριακής κακοηθείας, ενώ δεν εμφανίζουν μεταλλάξεις του *TP53*. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μερικά ορώδη καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοηθείας προέρχονται από χαμηλού βαθμού κακοηθείας καρκινώματα και όχι με την συνήθη αλληλουχία (Τύπου II) που ξεκινά από μεταλλάξεις του *TP53*. Το κωδωνικό άκρο των σαλπίγγων φυσιολογικά είναι σε άμεση επαφή με την επιφάνεια των ωοθηκών τη στιγμή της ωορρηξίας. Είναι αντιληπτό πως όταν το επιθήλιο της ωοθηκικής επιφάνειας διαρρηγνύεται την στιγμή της ωορρηξίας, φυσιολογικά κύτταρα επιθηλίου από τον κώδωνα των σαλπίγγων, μπορεί να μετακινηθούν και να εμφυτευθούν στην ωοθήκη σχηματίζοντας μια κύστη από την οποία μπορεί να αναπτυχθεί. Αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να εξηγήσει και την ανάπτυξη ενδοσαλπιγγίωσης, μιας βλάβης αποτελούμενης από αδενικούς σχηματισμούς και θηλώδεις δομές

επενδύόμενες από σαλπινγικού τύπου επιθήλιο που βρίσκεται στην περιτοναϊκή επιφάνεια της πυέλου, του επιπλόου και πίσω από τους πυελικούς και παρααορτικούς λεμφαδένες. Η ενδοσαλπινγγίωση συχνά συνυπάρχει με τον χαμηλού βαθμού κακοηθείας ορώδη καρκίνο και έχει θεωρηθεί ως πιθανή πρόδρομη κατάσταση αυτών των καρκίνων. Πάντως, η πιθανότητα ότι ορισμένοι υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδεις καρκίνοι ξεκινούν από μια μεταπλαστική διαδικασία από το ωοθηκικό επιθήλιο παρά από εμφύτευση φυσιολογικού σαλπινγικού επιθηλίου, δεν μπορεί να απορριφθεί πλήρως.

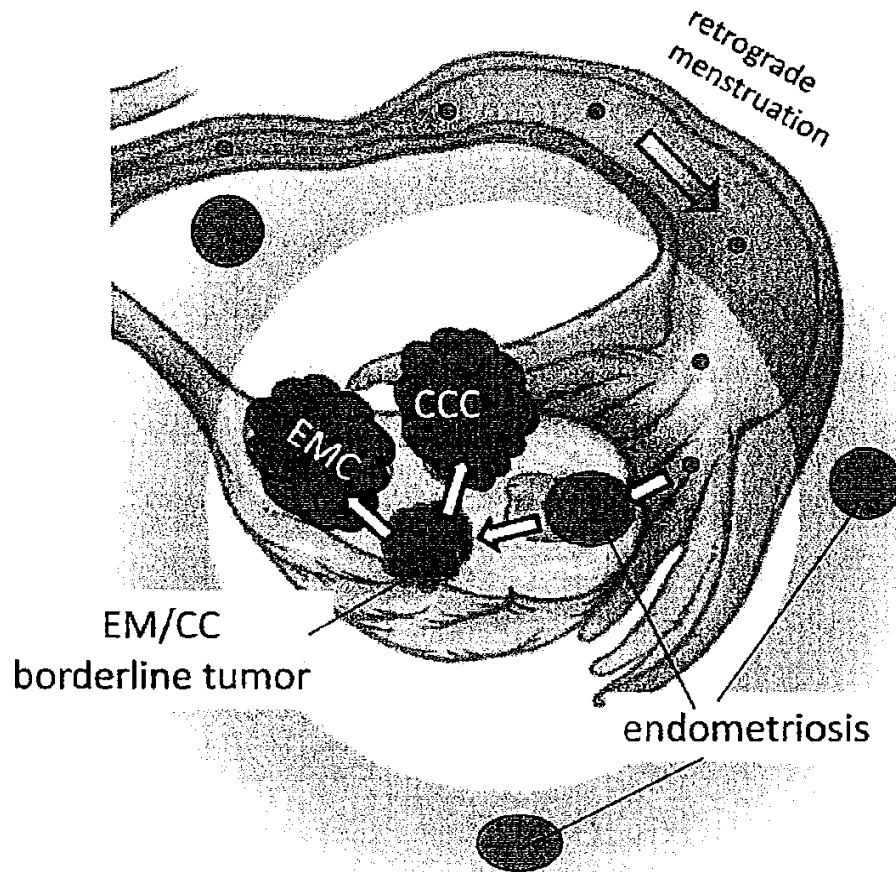
Η θεωρία της απευθείας εμφύτευσης σαλπινγικού επιθηλίου στις ωοθήκες για τον σχηματισμό κύστεων, οι οποίες θα είναι η έδρα έναρξης του ωοθηκικού ορώδους καρκίνου, αν και ακόμα δεν έχει αποδειχθεί, είναι μια ελκυστική εναλλακτική θεωρία από αυτήν της μετάπλασης του μεσοθηλίου. Εμφύτευση του σαλπινγικού επιθηλίου από το κωδωνι κό άκρο την στιγμή της ωορρηξίας, όταν το επιφανειακό επιθήλιο είναι διασπασμένο, μπορεί να εξηγήσει την ογκογένεση τόσο του χαμηλού όσο και του υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδους καρκίνου. Στην περίπτωση χαμηλού βαθμού κακοηθείας ορώδους καρκίνου, η διαδικασία εξελίσσεται αργά από το ορώδες κυσταδένωμα και το οριακής κακοηθείας ορώδες νεόπλασμα έπειτα από μεταλλάξεις στα *KRAS* και *BRAF* γονίδια, ενώ στην περίπτωση του υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδους καρκίνου η διαδικασία εξελίσσεται γρήγορα, έπειτα από μετάλλαξη στο *TP53* γονίδιο με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακού καρκίνου ως ενδιάμεσο στάδιο. Σύμφωνα με αυτή την οπτική γωνία και ο χαμηλού αλλά και ο υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδης καρκίνος είναι τελικά Μυλλεριανής προέλευσης και κατά έναν τρόπο η ωοθήκη εμπλέκεται δευτερογενώς [39,89].

Έχει εξακριβωθεί πλήρως και από μορφολογικές αλλά πρόσφατα και από μοριακές μελέτες ότι ο χαμηλού βαθμού κακοηθείας ενδομητριοειδής και ο διαυγοκυτταρικός καρκίνος αναπτύσσονται στο έδαφος ενδομητριοειδών κύστεων, που συχνά συνδυάζονται με εστίες ενδομητρίωσης σε άλλα μέρη της πυέλου. Παρ' όλο που η ακριβής θέση της ενδομητρίωσης δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, είτε αναπτύσσεται *in situ* στο περιτόναιο διαμέσου μιας διαδικασίας

μετάπλασης είτε από μια παλίνδρομη έμμηνο ρύση. Έτσι, αν η παλίνδρομος έμμηνος ρύση συναντάται στις περισσότερες περιπτώσεις ενδομητρίωσης, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι ο ενδομητριοειδής και διαυγοκυτταρικός καρκίνος αναπτύσσονται από ενδομητρικό ιστό (Μυλλεριανής προέλευσης) που εμφυτεύεται στην ωοθήκη και έτσι η ωοθήκη εμπλέκεται δευτερογενώς. Περαιτέρω ενδιαφέρον υπήρξε στην παρατήρηση ότι το έκτοπο ενδομήτριο σε γυναίκες με ενδομητρίωση εμφανίζει μοριακές αλλοιώσεις, όπως η ενεργοποίηση ογκογενών μονοπατιών. Πιθανώς, αυτές οι αλλοιώσεις επιτρέπουν στον ενδομητρικό ιστό να εμφυτευθεί, να επιβιώσει και να διεισδύσει στην ωοθηκική και την περιτοναϊκή επιφάνεια. Αυτή η υπόθεση από την οποία ο ενδομητριοειδής και διαυγοκυτταρικός καρκίνος αναπτύσσονται από ενδομητρικό ιστό εμφυτευμένο στις ωοθήκες υποστηρίζεται και από επιδημιολογικές μελέτες που έδειξαν την προστατευτική δράση της περίδεσης των σαλπίγγων έναντι μόνο των ενδομητριοειδών και διαυγοκυτταρικών καρκίνων της ωοθήκης .

Ομοίως, η προέλευση του βλεννώδους καρκίνου εντερικού τύπου και του καρκινώματος τύπου Brenner μπορεί επίσης να μην εμπλέκει πρωτογενώς τις ωοθήκες [130,131,132]. Η προέλευση αυτών των τύπων διερευνάται αφού σε αντίθεση από τον ορώδη, τον ενδομητριοειδή και τον διαυγοκυτταρικό τύπο, δεν παρουσιάζει Μυλλεριανό φαινότυπο. Ενώ είχε συζητηθεί πως ο βλεννώδης τύπος φέρει μια σχέση με τον ενδοτράχηλο, το βλεννώδες επιθήλιο που χαρακτηρίζει αυτές τις νεοπλασίες έχει περισσότερες ομοιότητες με τον γαστρεντερικό βλεννογόνο. Επιπλέον, η συχνή συνύπαρξη όγκων Brenner και βλεννώδους τύπου είναι γνωστή από χρόνια. Σε μια μελέτη βλεννωδών κυσταδενωμάτων και όγκων Brenner, αναφέρθηκε ότι τα βλεννώδη κυσταδενώματα περιείχαν εστίες Brenner στο 18% των περιπτώσεων. Επίσης ο βλεννώδης καρκίνος συχνά συνδυάζεται με καλοήθες μεταβατικού τύπου επιθήλιο, συχνά ευρισκόμενο σε παραωοθηκική και παρασαλπγγική θέση. Αυτά τα ευρήματα εγείρουν την υπόνοια πως ο βλεννώδης καρκίνος και ο τύπου Brenner έχουν την ίδια προέλευση. Μία μελέτη έδειξε ότι οι όγκοι Brenner είναι μικροί (μέσο μέγεθος 0,5cm, εύρος 0,02-20cm) ενώ τα βλεννώδη

κυσταδενώματα είναι συνήθως μεγαλύτερα (μέσο μέγεθος 9cm, εύρος 1-30cm). Μία υπόθεση είναι ότι ενώ ένας μικρός όγκος Brenner αναπτύσσεται, το βλεννώδες μέρος γίνεται κυρίαρχο δίνοντας ένα βλεννώδες κυσταδένωμα, το οποίο ενώ μεγαλώνει συμπιέζει και εντέλει εξαλείφει την διπλανή ωοθήκη δίνοντας την εντύπωση πως προέρχεται από την ωοθήκη.



Εικόνα 8: Προτεινόμενη ανάπτυξη για τον χαμηλού βαθμού ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικό καρκίνο. Ενδομητρικός ιστός, μέσω ενός μηχανισμού παλίνδρομης εμμήνου ρύσεως, εμφυτεύεται στην ωοθηκική επιφάνεια για τον σχηματισμό ενδομητριοειδούς κύστης από την οποία μπορεί να αναπτυχθεί χαμηλού βαθμού ενδομητριοειδής ή διαυγοκυτταρικός καρκίνος [131].

Ανακεφαλαιώνοντας καμία από τις υπάρχουσες θεωρίες δεν συνδυάζει επαρκώς όλα τα στοιχεία της ωοθηκικής καρκινογένεσης. Κάθε μια από αυτές έχει κάτι να προσφέρει στην εξήγηση για την ανάπτυξη του ωοθηκικού καρκίνου αλλά καμία δεν τα περιέχει όλα. Έχει διαπιστωθεί ότι αυτό που θεωρούνταν πρωτογενής επιθηλιακός ωοθηκικός και πρωτογενής περιτοναϊκός καρκίνος είναι εντέλει δευτερογενής. Τα πιο πειστικά στοιχεία στηρίζουν την άποψη ότι ο ορώδης καρκίνος αναπτύσσεται από το κωδωνικό άκρο των σαλπίγγων, ο ενδομητριοειδής και ο διαυγοκυτταρικός καρκίνος από ενδομητρικό ιστό που διαμέσου των σαλπίγγων καταλήγει σε ενδομητρίωση ενώ ο βλεννώδης καθώς και ο Brenner καρκίνος από μεταβατικού τύπου επιθήλιο ευρισκόμενο στο σαλπινγομεσοθηλιακό σύνδεσμο όπου οι κώδωνες έρχονται σε επαφή με το περιτόναιο. Η άποψη ότι το μεγαλύτερο μέρος των επιθηλιακών ωοθηκικών καρκίνων προέρχεται έξω από τις ωοθήκες και τις εμπλέκει δευτερογενώς προέκυψε πρόσφατα γιατί στο παρελθόν επικρατούσε η λανθασμένη άποψη ότι προερχόταν από την ωοθήκη. Ένας καρκίνος θεωρούνταν σαλπινγικός ως προς την προέλευση μόνο όταν το κύριο μέρος του όγκου αφορούσε την σάλπιγγα παρά την ωοθήκη και υπήρχαν ενδείξεις ενδοεπιθηλιακού *in situ* σαλπινγικού καρκίνου. Η διάγνωση περιτοναϊκού πρωτοπαθούς καρκίνου είναι ακόμα πιο περιορισμένη. Ακόμα και με εκτεταμένο όγκο που αφορά στο περιτόναιο, το επίπλουν και άλλα κοιλιακά όργανα, ένας όγκος θεωρείται πρωτογενής ωοθηκικός εάν υπάρχουν τουλάχιστον 5mm καρκίνου που εμπλέκουν την ωοθήκη [63,95,131].

8. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑ, SCREENING, ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Οι εφαρμογές αυτών των νέων θεωριών για την ωοθηκική καρκινογένεση είναι πολύ σημαντικές. Η ενοχοποίηση των σαλπίγγων όσον αφορά την προέλευση του ωοθηκικού ορώδους καρκίνου εξηγεί πολλές από τις προηγούμενες αναφορές που έδειχναν «υπερέκφραση» συγκεκριμένων γονιδίων στον ωοθηκικό καρκίνο. Το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων στο ωοθηκικό επιφανειακό επιθήλιο, το οποίο είναι μεσοθηλιακής προέλευσης,

είναι διαφορετικό από το σαλπιγγικό επιθήλιο το οποίο είναι Μυλλεριανής προέλευσης. Πράγματι, τα γονίδια που εκφράζονται στον ορώδη καρκίνο είναι παρόμοια με αυτά που βρίσκονται στις σάλπιγγες, ενώ το προφίλ έκφρασης του ενδομητριοειδούς και του διαυγοκυτταρικού καρκίνου προσομοιάζει στο ενδομητρικό επιθήλιο. Είναι ενδιαφέρον, επίσης, πως το προφίλ έκφρασης του βλεννώδους καρκίνου προσομοιάζει το φυσιολογικό επιθήλιο του παχέως εντέρου. Επίσης, το PAX8 είναι ένας δείκτης Μυλλεριανού τύπου επιθηλίου που εκφράζεται στον ωθηκικό ορώδη καρκίνο, αλλά όχι στο μεσοθήλιο ενώ η καλρετινίνη, ένας δείκτης μεσοθηλίου, που σχετίζεται με το ωθηκικό επιφανειακό επιθήλιο και το μεσοθηλίωμα αλλά όχι με το σαλπιγγικό επιθήλιο ή τον ωθηκικό ορώδη καρκίνο.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες πολλές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την ανάπτυξη δοκιμασιών διαλογής (screening tests) για τον καρκίνο ωοθήκης, με σκοπό να ανακαλύπτονται έγκαιρα όγκοι όταν είναι ακόμα εντοπισμένοι στην ωοθήκη και να βελτιώνονται έτσι τα ποσοστά της θεραπείας και να μειώνεται η θνησιμότητα. Οι σημερινές δυνατότητες για τη διαλογή των γυναικών συμπεριλαμβάνουν τη γυναικολογική εξέταση, το διακολπικό υπερηχογράφημα και τη μέτρηση στον ορό του δείκτη CA125. Η επίγνωση του δυαδικού μοντέλου, το οποίο τονίζει την ανομοιογένεια του ωθηκικού καρκίνου, δείχνει ξεκάθαρα πως ένα screening test δεν θα είναι ικανοποιητικό για όλους τους τύπους ωθηκικού καρκίνου. Οι νεοπλασίες Τύπου I (χαμηλού βαθμού κακοηθείας ορώδες, ενδομητριοειδές, διαυγοκυτταρικό και βλεννώδες καρκίνωμα) αναπτύσσονται και φθάνουν σε μεγάλο μέγεθος όταν είναι ακόμα στα όρια της ωοθήκης. Ανευρίσκονται εύκολα με την πυελική εξέταση και/ή το διακολπικό υπερηχογράφημα. Αποτελούν, όμως, μόνο το 25% των περιπτώσεων και είναι υπεύθυνες για το 10% των θανάτων από ωθηκικό καρκίνο. Για αυτό θα μπορούσε να ειπωθεί πως η ανάπτυξη μιας μεθόδου διαλογής των ασθενών δεν είναι επείγουσα ανάγκη για τους Τύπου I καρκίνους. Από την άλλη μεριά, η ανακάλυψη ότι το μεγαλύτερο μέρος των καρκίνων Τύπου II (υψηλόβαθμο ορώδες και αδιαφοροποίητο καρκίνωμα καθώς και καρκινοσάρκωμα) προέρχονται έξω από την ωοθήκη υπογραμμίζει

την ανάγκη για μια διαγνωστική προσέγγιση για την εντόπιση αυτών των καρκίνων όταν περιορίζονται ακόμα στην ωοθήκη. Επιπλέον, οι Τύπου II αποτελούν το 75% των περιπτώσεων και είναι υπεύθυνοι για το 90% των θανάτων από ωοθηκικό καρκίνο. Δυστυχώς, οι Τύπου II σπάνια περιορίζονται μόνο στην ωοθήκη. Από μια μελέτη 400 ασθενών από το νοσοκομείο της Ουάσινγκτον, λιγότερο από το 1,25% των υψηλόβαθμων ορωδών καρκινωμάτων περιορίζεται στην ωοθήκη. Η ματαιότητα της έγκαιρης ανίχνευσης των πρόωρων μορφών καρκίνου της ωοθήκης τονίσθηκε σε μια πολυκεντρική προοπτική μελέτη στην οποία παρά τον ετήσιο έλεγχο screening περίπου 35.000 γυναικών με CA125 και διακολπικό υπερηχογράφημα, το 70% των γυναικών ανιχνεύθηκαν σε προχωρημένο στάδιο της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά δεν είχαν καμία διαφορά από τον γενικό πληθυσμό. Για τους καρκίνους Τύπου II, ο σκοπός του screening θα έπρεπε να είναι η ανίχνευση μικρών όγκων και όχι χαμηλού σταδίου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω της παρουσίας ειδικών βιοδεικτών που εκφράζονται νωρίς στην ωοθηκική καρκινογένεση [89].

Όπως και με το screening test, η θεραπεία για τους καρκίνους Τύπου I και Τύπου II θα πρέπει να εξατομικευθεί. Οι Τύπου I είναι γενικά χαμηλού βαθμού, αναπτύσσονται αργά και είναι στα όρια των ωοθηκών τη στιγμή της διάγνωσης ενώ εξαπλώνονται αργά. Έτσι, όταν ευρίσκονται ακόμα στα όρια της ωοθήκης μια σαλπιγγοωοθηκεκτομή μπορεί να αρκεί. Από την άλλη μεριά, όταν έχουν εξαπλωθεί εκτός ωοθήκης, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που είναι δραστικοί εναντίον στους πιο ταχύτερα αναπτυσσόμενους καρκίνους Τύπου II, δεν είναι δραστικοί για τους Τύπου I διότι έχουν πιο αργή ανάπτυξη. Για αυτό τον λόγο, χρειάζεται μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για τα προχωρημένα στάδια της ομάδας Τύπου I.

Η προσέγγιση για τη θεραπεία των καρκίνων Τύπου II, πρέπει να είναι εντελώς διαφορετική από αυτή των Τύπου I. Πρέπει να βασίζεται στην ανίχνευση ειδικών βιοδεικτών, πριν η νόσος γίνει εμφανής. Ένα άλλο σημαντικό θέμα όσον αφορά στη θεραπεία που πρέπει να ληφθεί υπόψιν είναι εάν οι ασθενείς που βρίσκονται να έχουν ορώδες ενδοεπιθηλιακό σαλπιγγικό

καρκίνωμα πρέπει να υποβληθούν σε χημειοθεραπεία. Τα ευρήματα θετικών κυτταρολογικών πλύσεων σε ασθενείς με μόνο ορώδες ενδοεπιθηλιακό σαλπιγγικό καρκίνωμα δείχνουν ότι αυτές οι μικροσκοπικές βλάβες μπορεί να κρύβουν κακοήγη κύτταρα. Προς το παρόν δεν υπάρχουν οδηγίες για το αν αυτές οι γυναίκες πρέπει να λαμβάνουν αγωγή.

Τέλος, οι πολλές ενδείξεις ότι ο καρκίνος ωοθήκης δεν προέρχεται από τις ωοθήκες καθώς και η αποτυχία για ένα αξιόπιστο screening test, επιβάλλουν την εντατικοποίηση των προσπαθειών για πρωτογενή πρόληψη. Έχει ήδη αποδειχθεί σε επιδημιολογικές μελέτες πως η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου ωοθήκης. Ο κίνδυνος μειώνεται κατά 50% σε γυναίκες που κάνουν χρήση αντισυλληπτικών δισκίων για 5 ή περισσότερα χρόνια. Η εγκυμοσύνη μειώνει επίσης τον κίνδυνο κατά 50% σε σχέση με γυναίκες που δεν είχαν εγκυμοσύνη. Η κλασσική προσέγγιση για τη μείωση του κινδύνου σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου ωοθήκης ή σε γυναίκες με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* ήταν η ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων. Οι ωοθηκικοί καρκίνοι που αναπτύσσονται είναι σχεδόν πάντα υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδεις και δεν υπήρξαν ικανοποιητικές αποδείξεις ότι αυτές οι γυναίκες είναι σε υψηλό κίνδυνο για την ανάπτυξη ορώδους καρκίνου μήτρας. Εάν μπορέσει να αποδειχθεί ότι ο ορώδης καρκίνος σε αυτές τις γυναίκες προέρχεται σχεδόν αποκλειστικά από τον κώδωνα της σάλπιγγας τότε η σαλπιγγεκτομή από μόνη της θα μπορούσε να είναι ικανή να μειώσει τον κίνδυνο καρκίνου ωοθήκης. Αυτή η προσέγγιση θα πρέπει να αξιολογηθεί σε τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με την κλασσική αμφοτερόπλευρη σαλπιγγωθηκεκτομή. Επίσης για γυναίκες οι οποίες δεν θεωρούνται υψηλού κινδύνου αλλά που υποβάλλονται σε υστερεκτομή για καλοήθεις παθήσεις, πολλοί γυναικολόγοι πιστεύουν ότι πρέπει να εφαρμόζεται και αμφοτερόπλευρη αφαίρεση των ωοθηκών για να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου. Όμως αποδείχθηκε ότι σε σύγκριση με την διατήρηση των ωοθηκών, η ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων συνδυάστηκε με αυξημένο κίνδυνο όλων των αιτιών θανάτου, θανατηφόρα ή μη στεφανιαία

νόσος και καρκίνου του πνεύμονα. Για αυτό το λόγο σε γυναίκες που υποβάλλονται σε υστερεκτομή για καλοήθεις παθήσεις, η αφαίρεση μόνο των σαλπίγγων με διατήρηση των ωοθηκών ενδεχομένως θα βελτίωνε την ποιότητα ζωής και την επιβίωση ενώ θα μείωνε και τον κίνδυνο καρκίνου ωοθήκης.

Η καινούρια προσέγγιση για την παθογένεση του ωοθηκικού καρκίνου βασίζεται σε ένα δυαδικό μοντέλο.

Αυτό το προτεινόμενο μοντέλο ωστόσο δεν είναι ολοκληρωμένο και δεν καλύπτει όλα τα θέματα. Για παράδειγμα, ο διαυγοκυτταρικός καρκίνος κατηγοριοποιείται ως Τύπου I γιατί παρουσιάζει μια χαρακτηριστική μετάλλαξη του γονιδίου *PIKC3CA*, είναι γενετικά σταθερός, συχνά παρουσιάζεται σε στάδιο I και συνδυάζεται με ενδομητρίωση, μια καλά αναγνωρισμένη πρόδρομη βλάβη. Όμως, αντίθετα, με τους άλλους καρκίνους της ομάδας Τύπου I, ο διαυγοκυτταρικός είναι υψηλού βαθμού κακοηθείας κατά τη διάγνωση.

Συμπερασματικά οι πιο σημαντικοί αναφερόμενοι προγνωστικοί παράγοντες του καρκίνου ωοθηκών είναι το στάδιο της νόσου, ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, ο ιστολογικός τύπος και η έκταση της κυτταρομειωτικής χειρουργικής επέμβασης. Ωστόσο παραμένει ένας σημαντικός βαθμός βιολογικής ετερογένειας ακόμα και μεταξύ των ίδιων προγνωστικών υποομάδων, δυσχεραίνοντας την ακριβή πρόβλεψη της κλινικής συμπεριφοράς σε εξατομικευμένες περιπτώσεις. Όμως, η βελτίωση της γνώσης μας όσον αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου ωοθηκών είναι επιβεβλημένη προκειμένου να καθοριστούν ομάδες ασθενών με ιδιαίτερα πτωχή πρόγνωση. Κατά συνέπεια η προσπάθεια που καταβάλλεται να ενοποιηθούν τα ποικίλα ερευνητικά δεδομένα στα πλαίσια μίας ενιαίας θεωρίας αποτελεί μία ακόμη υπόθεση ως προς την παθογένεια του καρκίνου των ωοθηκών [131,144,145].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Πρόσφατα, διάφορες ομάδες έχουν αναφέρει ότι η ανοσοϊστοχημική εντόπιση των πρωτεϊνών MCM αποτελεί ειδικό και ακριβή δείκτη των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Άλλα πλεονεκτήματα των πρωτεϊνών MCM είναι ότι δεν εντοπίζονται σε κύτταρα που επιδιορθώνουν ενεργά το DNA τους, και η έκφρασή τους δεν καταστέλλεται υπό συνθήκες θρεπτικής ένδειας, όπως αυτές που παρατηρούνται τοπικά σε συμπαγείς όγκους. Επίσης η λειτουργία τους, που έχει επαρκώς χαρακτηριστεί σε διάφορα συστήματα *in vitro*, αντιπροσωπεύει σημείο σύγκλισης διαφόρων σημαντικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Τα επίπεδά τους αλλάζουν ελάχιστα κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, και μειώνονται σε σημαντικό βαθμό σε κύτταρα με χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού.

Μέχρι στιγμής, υπάρχει μόνο μία πρόσφατη μελέτη που διερευνά τις πρωτεΐνες MCM σε νεοπλάσματα των ωοθηκών. Όμως αυτή η μελέτη επικεντρώθηκε κατ' αποκλειστικότητα στα ορώδη νεοπλάσματα και μελετά μόνο την έκφραση της πρωτεΐνης MCM-2. Πιο σημαντικό ακόμη είναι το γεγονός ότι τίποτε δεν είναι γνωστό σχετικά με την προγνωστική αξία των πρωτεϊνών MCM στον καρκίνο των ωοθηκών.

Η αδιαμφισβήτητη εμπλοκή των πρωτεϊνών RPA σε αποκρίσεις αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA τις καθιστά δυνητικούς συμμετόχους στην παθολογία των ανθρώπινων νεοπλασιών επειδή τόσο η καρκινογένεση όσο και η καρκινική αύξηση σχετίζονται με την απορύθμιση της αντιγραφής του DNA και την καταστολή των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Μέχρι τώρα δεν έχει εκπονηθεί κάποια μελέτη η οποία να διερευνά το ρόλο των RPA σε ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινώματα ωοθηκών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή σκοπός είναι να διερευνηθεί η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών MCM-2, MCM-5 και RPA2 σε μία σειρά νεοπλασμάτων των ωοθηκών και να καθοριστούν για πρώτη φορά οι πιθανές συσχετίσεις με κλινικο-παθολογοανατομικές παραμέτρους, με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67, με άλλους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου καθώς και με την κλινική πορεία (έκβαση) των ασθενών.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Γενικά στοιχεία ασθενών

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής συγκεντρώθηκαν 204 ασθενείς με επιθηλιακούς όγκους ωοθηκών οι οποίοι διεγνώσθησαν και θεραπεύθησαν στο Γενικό Νοσοκομείο ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ και στο Γυναικολογικό Ινστιτούτο Αθηνών ΙΑΣΩ κατά την διάρκεια των ετών 1989 – 2004 και για τους οποίους ήταν διαθέσιμα κύβοι παραφίνης και κλινικές πληροφορίες. Εξ αυτών οι 161 περιπτώσεις αφορούν σε αδενοκαρκινώματα και οι 43 περιπτώσεις πληρούν τα κριτήρια όγκων ωοθήκης χαμηλού κακοήθους δυναμικού [95,100]. Η ιστολογική κατάταξη των όγκων βασίζεται στο σύστημα της Π.Ο.Υ. [100]. Η διάγνωση «πτωχά διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα» [100] δόθηκε σε εκείνα τα καρκινώματα τα οποία δεν έδειξαν εμφανή κυτταρική διαφοροποίηση. Τα αδενοκαρκινώματα διαχωρίζονται σε καλής, μέσης και χαμηλής διαφοροποίησεως και η κλινική σταδιοποίηση των ασθενών καθορίζεται με βάση τα κριτήρια της Διεθνούς Ομοσπονδίας της Γυναικολογίας και Μαιευτικής (FIGO) [8]. Χειρουργικά και παθολογικά ευρήματα και μετεγχειρητικές αξονικές τομογραφίες της περιοχής κοιλίας χρησιμοποιήθηκαν για να καθορίσουν το στάδιο των ωοθηκικών αδενοκαρκινωμάτων κατά FIGO και της υπολειμματικής νόσου μετά την αρχική χειρουργική επέμβαση. Η παραμονή νεοπλασματικών μαζών $\mu\delta < 2\text{εκ.}$ ορίστηκε σαν η ελάχιστη υπολειμματική νόσος, ενώ παρουσία μαζών $\mu\delta > 2\text{εκ.}$ ορίστηκε σαν μαζική υπολειμματική νόσος [5,101].

Όλες οι ασθενείς με καρκίνωμα υπεβλήθησαν σε ολική υστερεκτομή με αμφοτερόπλευρη σαλπιγγο-ωοθηκεκτομή ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία. Καμία ασθενής δεν υπεβλήθη σε προεγχειρητική χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά αυτών των ασθενών περιγράφονται στον πίνακα 8. Η παρακολούθηση ήταν εφικτή σε 155 ασθενείς. Κατά την διάρκεια της έρευνας 48 ασθενείς κατέληξαν λόγω της ασθένειάς τους μετά από μέσο χρόνο

επιβίωσης 15.6 (εύρος:1-60) μηνών. Η μέση τιμή παρακολούθησης για τους υπόλοιπους ασθενείς ήταν 43 (εύρος 11,7 – 65) μήνες.

Πίνακας 8: Κλινικά στοιχεία των ασθενών του υπό εξέταση δείγματος.

Ηλικία	
Διάμεσος τιμή (εύρος	51,6 (20-86)
Ιστολογικός τύπος	
ΧΚΔ όγκοι	
Ορώδεις	29 (67,4%)
Βλεννώδεις	14 (32,6%)
Αδενοκαρκινώματα	
Ορώδη	92 (57%)
Βλεννώδη	14(8,6%)
Ενδομητριοειδή	22 (13,67%)
Διαυγοκυτταρικά	22 (13,67%)
Πτωχά διαφοροποιημένα	7 (4,3%)
Αταξινόμητα	4 (2,48%)
Βαθμός διαφοροποίησης	
1	19 (11,8%)
2	68 (42,2%)
3	74 (45,9%)
Στάδιο κατά FIGO	
I	25 (15,52%)
II	13 (8,1%)
III	96 (59,62%)
IV	23 (14,28%)
Άγνωστο	4 (2,48%)
Πρωτοπαθής υπολειμματική νόσος	
Οχι	39 (24,2%)
Ναι	46 (28,57)
Άγνωστο	
Συμπληρωματική χημειοθεραπεία	
Με παράγοντες πλατίνης	101(62,7%)
Χωρίς παράγοντες πλατίνης	60(37,3%)
Κλινική έκβαση	
Θάνατος από καρκίνωμα ωοθηκών	48 (29,8%)
Εν ζωή	107 (66,45%)
Άγνωστο	6 (3,75%)

Επεξεργασία των υλικών και ανοσοϊστοχημεία: Μετά την χειρουργική αφαίρεση οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν άμεσα σε 10% ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης και τελικώς εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης. Τομές πάχους 4mm χρησιμοποιήθηκαν από κάθε περιστατικό σε ειδικά επικαλυμμένα πλακίδια (Superfrost TM) και αποξηράνθηκαν με ολονύκτια επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C. Επιπρόσθετα από προηγούμενες έρευνες [58,59,120] υπήρχαν αποτελέσματα διαθέσιμα για τις 128 περιπτώσεις για την έκφραση των πρωτεϊνών p53, p27^{Kip1}, pRb, p21^{WAF} και για όλες τις περιπτώσεις για το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα :

- Στα 173 περιστατικά πραγματοποιήθηκε ανοσοχρώση:

1) MCA 1859 έναντι της πρωτεΐνης MCM-2 (κλώνος CRCT2.1/D1.9H5) και

2) MCA 1860 έναντι της πρωτεΐνης MCM- 5 (κλώνος CRCT5.1/A2.7A3).

- Στα 76 περιστατικά πραγματοποιήθηκε ανοσοχρώση RPA2 έναντι της υπομονάδας RPA34 (NA18, Oncogene).

Και για τα τρία αντισώματα η αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων επετεύχθη σε διάλυμα κιτρικού οξέος pH 6.0 με επώαση σε φούρνο μικροκυμάτων για 30 λεπτά στα 750W. Η μέθοδος υπεροξειδάσης χρησιμοποιήθηκε με το kit της Dako υπό την εμπορική ονομασία Envision. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν γνωστοί θετικοί μάρτυρες (φυσιολογική αμυγδαλή) καθώς και αρνητικοί (τομές παραφίνης οι οποίες επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα αποτελούμενα από μη- ανοσοποιημένο ορό επίμυος).

Οι χρώσεις για τις MCM-2, MCM-5 και RPA2 εκτιμήθηκαν τυφλά από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους οι οποίοι δεν γνώριζαν τις σχετικές κλινικές πληροφορίες. Στις περιπτώσεις στις οποίες υπήρχε ασυμφωνία στην εκτίμηση > 5% τα πλακίδια εξετάσθηκαν από κοινού και εδόθη συναινετική εκτίμηση. Πυρήνες από περίπου 1000 κύτταρα του όγκου από τυχαία εξεταζόμενα πεδία (X40) σε όλη την έκταση της τομής

μετρήθηκαν και η έκφραση (LI) υπολογίστηκε σαν το ποσοστό των χρωσμένων πυρήνων προς τον ολικό αριθμό των νεοπλασματικών κυττάρων που μετρήθηκαν. Στις μετρήσεις δεν περιελήφθησαν ενδοθηλιακά ή λεμφοειδή κύτταρα παρότι εκφράζουν τις πρωτεΐνες MCM-2, MCM-5 και RPA2. Η ένταση του RPA2 χρώσης κατηγοριοποιήθηκε ως αχνή, μέτρια και έντονη. Οι ανοσοχρώσεις MCM2 και MCM5 δεν παρουσίαζαν διακύμανση όσον αφορά στην ένταση μεταξύ των εξεταζόμενων περιστατικών.

Κυτταροκαλλιέργεια: Κύτταρα MDAH -2774 καλλιεργήθηκαν σαν μονοστρωματικές καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο RPMI, συμπληρωμένο με 10% FCS, 1% L- γλουταμίνη, 50mg/ml στρεπτομυκίνη και 50 U/ ml πενικιλίνη (gibco – BRL / Life Technologies, Eggeenstein, Germany). Τα τρυβλία της κυτταροκαλλιέργειας (Nunc, Wiesba-den, Germany) τοποθετήθηκαν σε υγρή ατμόσφαιρα 5% διοξειδίου του άνθρακα στους 37° C. Επαρκώς ανεπτυγμένες κυτταρικές καλλιέργειες ξεπλύθηκαν με διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS, ph7.4, 140mM NaCl, 6.5mM Na₂HPO₄, 2.5mM KCL, 1,5mM KH₂PO₄) και συλλέχθηκαν μετά από 3λεπτη επεξεργασία με 0,25% θρυψίνη/ 0,02% EDTA σε PBS. Ίσες ποσότητες από το μέσον της καλλιέργειας προστέθηκαν και τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 600g και επαναιωρήθηκαν σε PBS για περαιτέρω επεξεργασία.

Κυτταρικός συγχρονισμός με αγωγή με νοκοδαζόλη: Μιτωτική παύση επετεύχθη προσθέτοντας 50 νανογραμμάρια νοκοδαζόλης ανά ml καλλιέργειας (Sigma, Geisen-hofen, Germany) από πυκνό διάλυμα 500mg νοκοδαζόλης ανά ml διαλύματος διμεθυλοσουλφοξιδάσης (DMSO) στο μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες. Μετά από 24ωρη αγωγή κύτταρα σε φάση G1 συλλέχθηκαν άμεσα με ήπια ανάδευση και ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS.

Ανοσοφθορισμός και ανοσοϊστοχημεία: Μετά την συλλογή των συγχρονισμένων και αποσυγχρονισμένων κυττάρων τούτα υπεβλήθησαν σε επεξεργασία με θρυψίνη αφού τοποθετήθηκαν (σε 1X10⁵ κύτταρα/ml) σε

ειδικά πλακίδια 6 θέσεων δειγμάτων και μονιμοποιήθηκαν με ήπια αποκόλληση του μέσου καλλιέργειας και πρόσθεση 2% φορμαλδεΐδης σε PBS (ph περίπου 7.4) για 10 λεπτά σε πάγο. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε 0,25% Triton X-100 για 5 λεπτά σε πάγο και ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS που περιείχε 4% BSA. Αμέσως μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας πλακίδια για ανοσοφθορισμό επώαστηκαν όλη την νύχτα με ki-67, MCM-2 και MCM-5 αντισώματα σε 4° C, αραιώθηκαν 1:20 σε υγρό θάλαμο, ακολούθως ξεπλύθηκαν σε PBS εμπλουτισμένο με 4% BSA και επώαστηκαν με FITC- συζευγμένο έναντι ανοσοσφαιρίνης μύος δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) για 1 ώρα σε 4° C. Για την ανοσοϊστοχημεία ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία υποκαθιστώντας το FITC- συζευγμένο έναντι ανοσοσφαιρίνης επίμυος δευτερογενές αντίσωμα με το kit της DAKO με το εμπορικό όνομα Envision, όπως χρησιμοποιείται για την ανοσοϊστοχημεία των ιστικών δειγμάτων. Οι αραιώσεις για ki-67, MCM-2 και MCM-5 σε αυτήν την περίπτωση ήταν 1:300, 1:400 και 1:100 αντίστοιχα. Τόσο για την ανοσοϊστοχημεία όσο και για τον ανοσοφθορισμό κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Μετά από το ξέπλυμα με PBS όλα τα πλακίδια τελικά επώαστηκαν σε γλυκερόλη και εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο. Τουλάχιστον 300 κύτταρα εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο σε μέση και υψηλή μεγέθυνση και το ποσοστό των κυττάρων που εξέφρασαν πυρηνική ανοσο-αντίδραση ή ανοσοφθορισμό για το ki-67 και τις MCM πρωτεΐνες σημειώθηκε. Οι εικόνες αποθηκεύθηκαν ως αρχεία TIF.

Στατιστική ανάλυση: Η πιθανότητα κανονικής κατανομής ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov- Smirnov. Συσχετισμοί μεταξύ της έκφρασης των MCM-2, MCM-5 και RPA2 και του ιστολογικού τύπου, του βαθμού διαφοροποίησης, του σταδίου και της παρούσας υπολειμματικής νόσου εκτιμήθηκαν κατάλληλα με το Mann-Whitney U-test και την δοκιμασία Kruskal- Wallis. Οι συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων πραγματοποιήθηκαν με συντελεστή συσχέτισης του Spearman. Η

διαφορά μεταξύ των ποσοστών έκφρασης μεταξύ των MCM-2 και MCM-5 και του ki-67 στα αδενοκαρκινώματα ωοθηκών εξετάστηκε με τη δοκιμασία Wilcoxon signed-rank test κατά ζεύγη.

Η ανάλυση επιβίωσης περιορίστηκε στα αδενοκαρκινώματα δεδομένου ότι οι οριακής κακοήθειας όγκοι έχουν ευνοϊκή κλινική πορεία. Τα προ-γνωστικά αποτελέσματα των διαφόρων παραμέτρων (π.χ. ηλικία, ιστο-λογικός τύπος, βαθμός διαφοροποίησης, στάδιο κατά FIGO, υπολειμματική νόσος, είδος χημειοθεραπείας, έκφραση MCM-2, MCM-5 και RPA2 ελέγχθηκαν με καμπύλες επιβίωσης σύμφωνα με την μέθοδο Kaplan – Meier και οι συγκρινόμενες ομάδες ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία log-rank, όπως και με πολυπαραγοντική ανάλυση κατά Cox. Οι ασθενείς που κατέληξαν από άλλη αιτία κατά την διάρκεια της περιόδου της παρακολούθησης αντιμετωπίστηκαν ως περικεκομμένα δεδομένα. Στην μονοπαραγοντική ανάλυση οι αριθμητικές παράμετροι ηλικία, έκφραση των MCM-2, MCM-5 και RPA2 κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεσο τιμή. Για να αποφευχθεί το συστηματικό σφάλμα των δεδομένων, οι αριθμητικές παράμετροι εισήχθησαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση σαν συνεχείς παράμετροι. Δεδομένου ότι οι MCM-2 και MCM-5 σχετίζονται μεταξύ τους, η σημασία τους σαν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες εξετάστηκε σε διαφορετικά μοντέλα.

Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό STATA των Windows (STATA / 9.0). Τιμή p μικρότερη ή ίση του 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Στη μελέτη των MCM2 και MCM5 πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν οι 128 ασθενείς (85 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα των ωοθηκών και 43 με νεοπλάσματα οριακής κακοήθειας) ως βασική ομάδα ασθενών, ενώ οι υπόλοιποι 45 ασθενείς για τους οποίους υπήρχαν πληροφορίες σχετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου για την επιβεβαίωση (validation) των αποτελεσμάτων της μονοπαραγοντικής ανάλυσης επιβίωσης.

Τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής ανάλυσης επιβίωσης για την έκφραση των MCM-2 και MCM-5 στην βασική ομάδα των 128 ασθενών χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί ο απαιτούμενος αριθμός ασθενών στην ομάδα ελέγχου για μία επαρκή και ισχυρή ανάλυση (90%) [66,67]. Οι Lachin και συνεργάτες έδειξαν ότι η εξίσωση που συσχετίζει το συνολικό μέγεθος του δείγματος επιτρέποντας τη μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης σε απλές ομάδες δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\sqrt{N}|\lambda_e - \lambda_c| = Z_\alpha \sqrt{\phi(\bar{\lambda})(Q_e^{-1} + Q_c^{-1})} + Z_\beta \sqrt{\phi(\lambda_e)Q_e^{-1} + \phi(\lambda_c)Q_c^{-1}}$$

Όπου λ_e και λ_c αντιπροσωπεύουν τους παράγοντες κινδύνου των δύο ομάδων και τα $Q_i = n_i/N$, $\bar{\lambda} = Q_c \lambda_c + Q_e \lambda_e$ και Z_α , Z_β αποτελούν τις πρώτες παραγώγους στα επίπεδα α και β αντιστοίχως.

Δεδομένου ότι η μελέτη μας περιλαμβάνει ανομοιογενείς ασθενείς και συνεπώς μη ομοιόμορφη παρακολούθηση των ασθενών αυτός ο τύπος μπορεί να τροποποιηθεί όταν υποθέσουμε την κάτωθι εκθετική εισαγωγή [67]:

$$\phi(\lambda) = \lambda^2 \left[1 + \frac{\gamma e^{-\lambda T} [1 - e^{(\lambda - \gamma)R}]}{(1 - e^{-\gamma R})(\lambda - \gamma)} \right]$$

Το μέγεθος του δείγματος μπορεί να υπολογιστεί με την αντικατάσταση αυτού του τύπου στον παραπάνω.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έκφραση των MCM-2 και MCM-5 σε οριακής κακοήθειας όγκους και αδενοκαρκινώματα ωοθήκης (πίνακας 9)

Πίνακας 9: Έκφραση των MCM-2 και MCM-5 σε όγκους οριακής κακοήθειας και ωοθηκικά αδενοκαρκινώματα

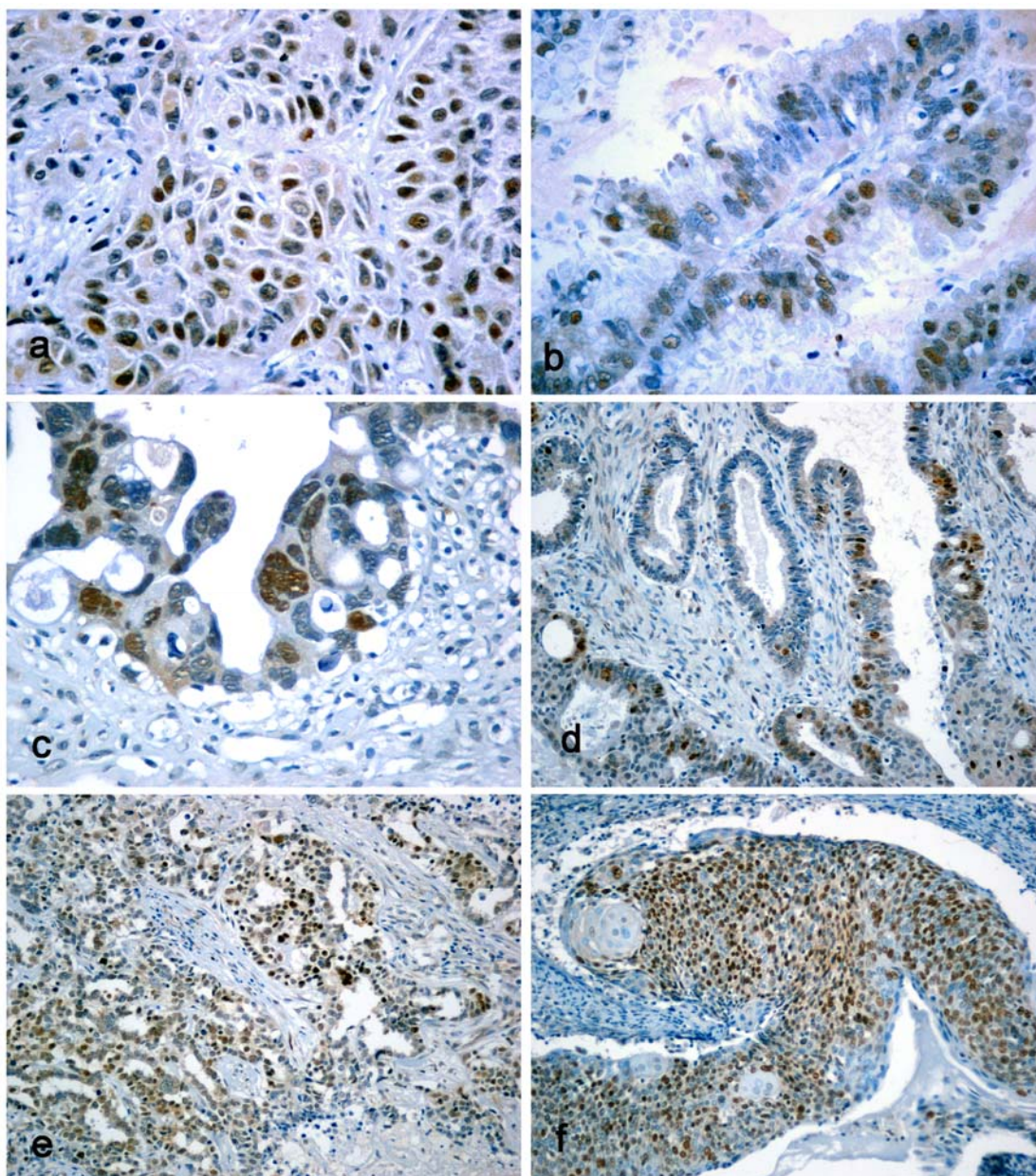
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	MCM-2 LI (%) διάμεσος τιμή (εύρος)	MCM-5 LI (%) διάμεσος τιμή (εύρος)
Οριακής κακοήθειας όγκοι, n=42		
Ορώδεις	5,5 (1-25)	10 (2-20)
Βλεννώδεις	5 (1-15)	5 (1-20)
Αδενοκαρκινώματα, n=72		
Ορώδη	20 (2-60)	22,5(7-70)
Βλεννώδη	20 (8-35)	24 (15-70)
Ενδομητριοειδή	17,5 (8-82)	27,5 (8-80)
Διαυγοκυτταρικά	15(2-70)	20 (5-50)
Πτωχά διαφοροποιημένα / αταξινόμητα	35 (20-50)	40 (10-75)

Έκφραση των πρωτεϊνών MCM-2 και MCM-5 παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις και κυμαίνεται από 1% έως 82% (διάμεσος τιμή 15%) και από 1% έως 75% (διάμεσος τιμή 20%), αντιστοίχως. Η χρώση ήταν κυρίως πυρηνική, εντούτοις παρατηρήθηκε μία αμυδρή κυτταροπλασματική χρώση, η οποία και δεν λήφθηκε περαιτέρω υπόψη κατά την ανάλυση σύμφωνα και με προηγούμενες δημοσιευμένες πληροφορίες. Κύτταρα θετικά ως προς τις MCM-2 και MCM-5 ήταν τυχαία κατανεμημένα σε όλο το εύρος του νεοπλάσματος σε 110 και 112 περιπτώσεις αντίστοιχα. Μία στατιστικά σημαντική θετική σχέση ανευρέθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 ($p<0.0001$). Η διάμεσος τιμή έκφρασης των MCM-2

και MCM-5 ήταν σαφώς υψηλότερη στα αδενοκαρκινώματα (20% και 24% αντίστοιχα), συγκρινόμενη με αυτή των όγκων χαμηλού κακοήθους δυναμικού (5% και 6% αντίστοιχα) (Mann-Whitney δοκιμασία, $p < 0,0001$ για τις δύο συσχετίσεις). Πιο συγκεκριμένα στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ οριακής κακοήθειας όγκων και αδενοκαρκινωμάτων εντοπίστηκαν για την έκφραση της πρωτεΐνης MCM-2 μεταξύ των ορώδων και βλεννώδων ιστολογικών τύπων (Mann-Whitney δοκιμασία, $p < 0,0001$ για τα ορώδη και $p = 0,0070$ για τα βλενώδη νεοπλάσματα) και για την έκφραση της πρωτεΐνης MCM-5 (Mann-Whitney δοκιμασία, $p < 0,0001$ για ορώδη και $p = 0,0020$ για βλενώδη νεοπλάσματα). Στα αδενοκαρκινώματα μόνον η έκφραση της MCM-5 (και όχι της MCM-2) συσχετίστηκε με τον ιστολογικό τύπο (Kruskal- Wallis ANOVA, $p = 0,00349$) με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στα πτωχά διαφοροποιημένα και τα αταξινόμητα καρκινώματα. Εντούτοις, όταν εξαιρέθηκαν από την ανάλυση τα φτωχά διαφοροποιημένα και τα αταξινόμητα καρκινώματα (δύο κατηγορίες νεοπλασμάτων που αντιπροσωπεύουν υψηλόβαθμη κακοήθεια) τότε η δοκιμασία δεν απέβη στατιστικά σημαντική (Kruskal- Wallis, διόρθωση Bonferroni $p = 0,0856$).

Έκφραση των MCM-2 και MCM-5 στα αδενοκαρκινώματα ωοθήκης σε σχέση με κλινικο-παθολογοανατομικές παραμέτρους (εικόνα 9)

Η έκφραση των MCM-2 και MCM-5 αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση του βαθμού κακοήθειας του καρκινώματος (1 vs 2 vs 3, έλεγχος Kruskal- Wallis $p = 0.0002$ και $p = 0,0006$ αντίστοιχα, Πίνακας 10) και την παρουσία υπολειμματικής νόσου (Mann-Whitney, $p = 0,0010$ και στις δύο σχέσεις). Στατιστικά σημαντική θετική σχέση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 και στάδιο του όγκου (I και II vs III, και IV, Kruskal- Wallis, $p = 0.0062$ και $p = 0,0018$ αντίστοιχα, **πίνακας 10**).



Εικόνα 9: Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών MCM -2 και MCM-5 σε ωθηκικά καρκινώματα **Α)** έκφραση της MCM2 σε πολλούς πυρήνες σε grade 3 ενδομητριοειδές ωθηκικό καρκίνωμα (μεγέθυνση x400) **Β)** έκφραση της πρωτεΐνης MCM -2 σε grade 1 βλεννώδες ωθηκικό καρκίνωμα, διάσπαρτοι θετικοί πυρήνες (μεγέθυνση x400) **Γ)** έκφραση της πρωτεΐνης MCM -5 σε grade 3 ορώδες ωθηκικό καρκίνωμα (μεγέθυνση x400) **Δ)** μέτρια ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης MCM -5 σε grade 2 ενδομητριοειδές ωθηκικό καρκίνωμα (μεγέθυνση x200) **Ε)** Ισχυρή έκφραση της MCM-2 σε ένα grade 2 ορώδες αδενοκαρκίνωμα ωθήκης (μεγέθυνση x200) **ΣΤ)** Διάχυτη χρώση MCM-5 σε grade 3 ενδομητριοειδές ωθηκικό καρκίνωμα (αρχική μεγέθυνση x200)

Πίνακας 10: Η έκφραση των MCM-2 και MCM-5 σε συνάρτηση με τις κλινικοπαθολογο-ανατομικές παραμέτρους στα ωοθηκικά αδενοκαρκινώματα.

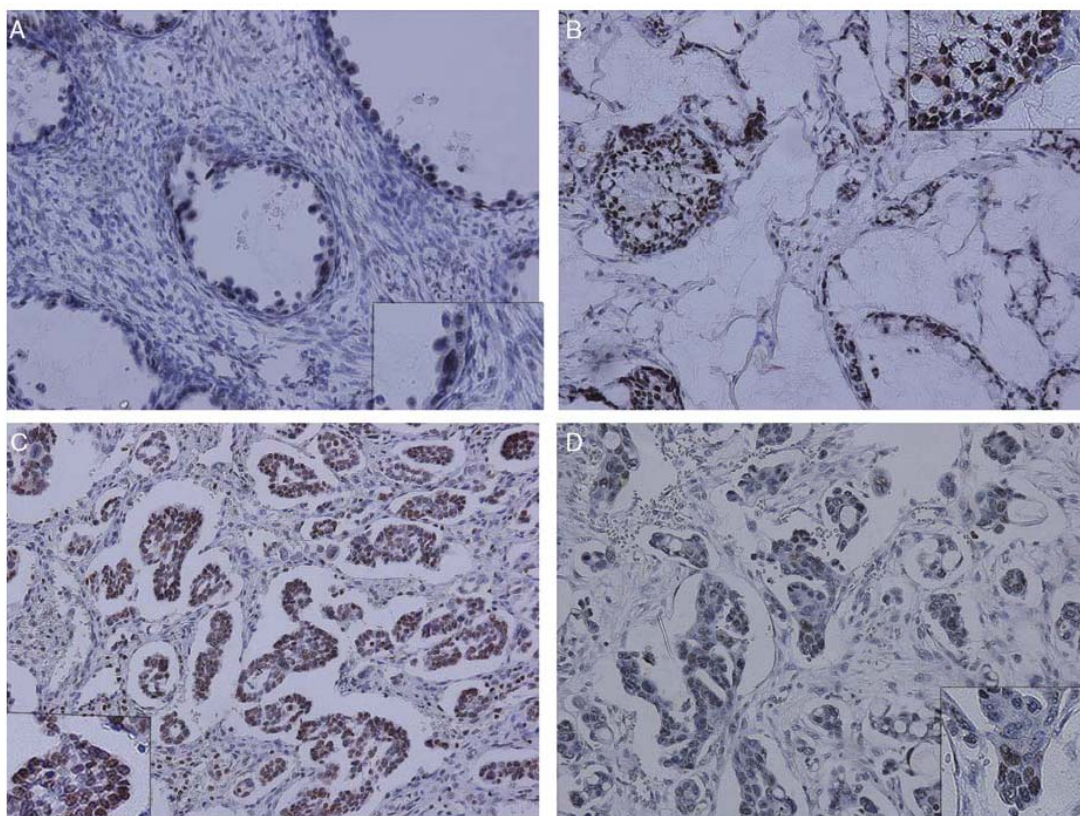
Παράμετροι	MCM-2 LI (%) διάμεσος τιμή (εύρος)	MCM-5 LI (%) διάμεσος τιμή (εύρος)
Βαθμός διαφοροποίησης		
1	10 (2-50)	30 (3-70)
2	17,5 (5- 45)	20 (5-60)
3	30 (5-82)	42,5(5-80)
Kruskal – Wallis test	P=0,0002	P=0,0006
Στάδιο		
I - II	15 (2-50)	20 (3-75)
III - IV	20 (5-82)	35 (5-80)
Mann – Whitney U test	P=0,0062	P=0,0018
Υπολειμματική νόσος		
Οχι	15 (2-45)	20 (3-70)
Ναι	27,5 (5-82)	35 (10-80)
Mann – Whitney U test	P=0,0030	P=0,0010

Έκφραση της RPA2 και συσχέτιση της με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (εικόνα 10)

Σε όλο το δείγμα, η έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 ήταν πυρηνική και παρατηρήθηκε σε όλες τις υπό εξέταση περιπτώσεις σε ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 20- 95% (διάμεσος τιμή 55%). Η ένταση της χρώσης ποικίλει από περίπτωση σε περίπτωση με 27 περιπτώσεις να εμφανίζουν αχνή ένταση (αριθμός περιπτώσεων που αντιπροσωπεύει ποσοστό 37%), 23 περιπτώσεις να εμφανίζουν μέτρια ένταση (ποσοστό 31,5%) και 22 περιπτώσεις να εμφανίζουν έντονη ένταση (ποσοστό 31,5%). Το φυσιολογικό επιθήλιο των ωοθηκών όπου αναγνωρίστηκε ήταν αρνητικό ειδικά για RPA2. Η έκφραση της RPA2 σχετίζεται θετικά με το στάδιο του όγκου (Mann-Whitney, $p=0.0053$, II/IIIB έναντι IIIC/IV, πίνακας 11, εικόνα 11) ενώ δεν σχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου και το βαθμό διαφοροποίησης, όπως επίσης και με την ηλικία του ασθενούς ($p>0.10$). Επιπλέον η ένταση της χρώσης του RPA2 δεν σχετίζεται με καμία από τις εξεταζόμενες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Στα ορώδη καρκινώματα

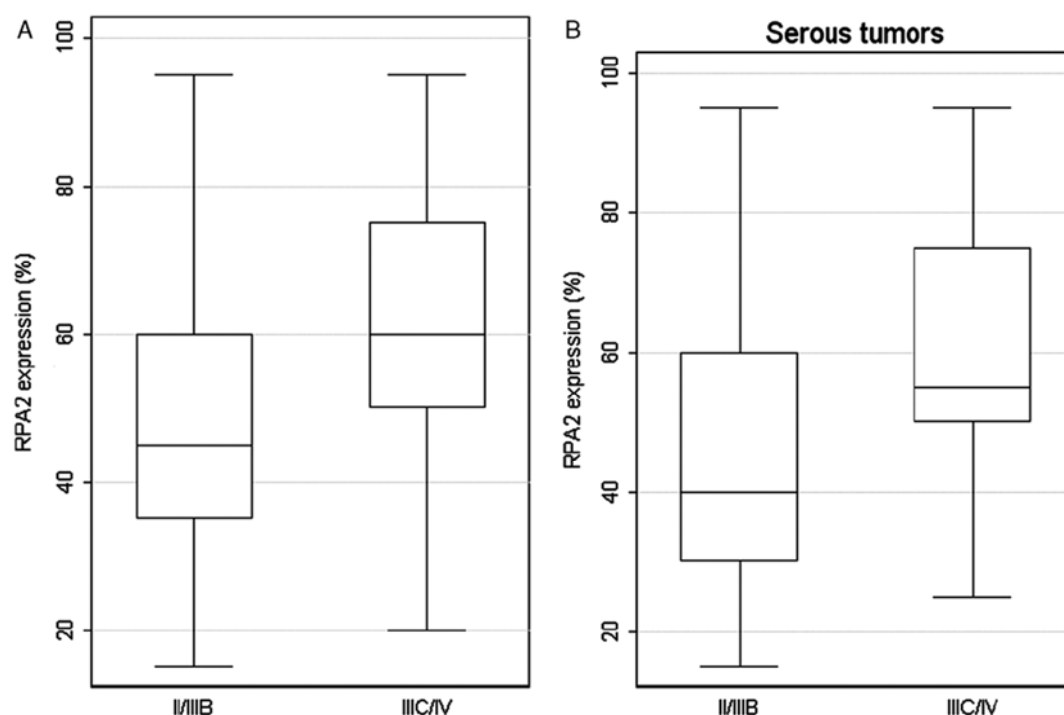
Όταν η ανάλυση περιορίστηκε στα ορώδη καρκινώματα η σχέση μεταξύ της έκφρασης του RPA2 και του καρκινικού σταδίου παρέμεινε στατιστικά σημαντική (Mann-Whitney, $p=0.0053$, II/IIIB έναντι IIIC/IV, εικόνα 13), ενώ τα υψηλόβαθμης κακοήθειας καρκινώματα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της RPA2 (Mann-Whitney, $p=0.0416$).



Εικόνα 10: Έκφραση της RPA2 σε Α) διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (x400) Β) Grade I βλεννώδες καρκίνωμα (x200) Γ) Grade III/ υψηλόβαθμης κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα (x200) Δ) Grade II/ χαμηλόβαθμης κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα (x400)

Πίνακας 11: Έκφραση της RPA2 σε συνδυασμό με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους στα καρκινώματα των ωοθηκών.

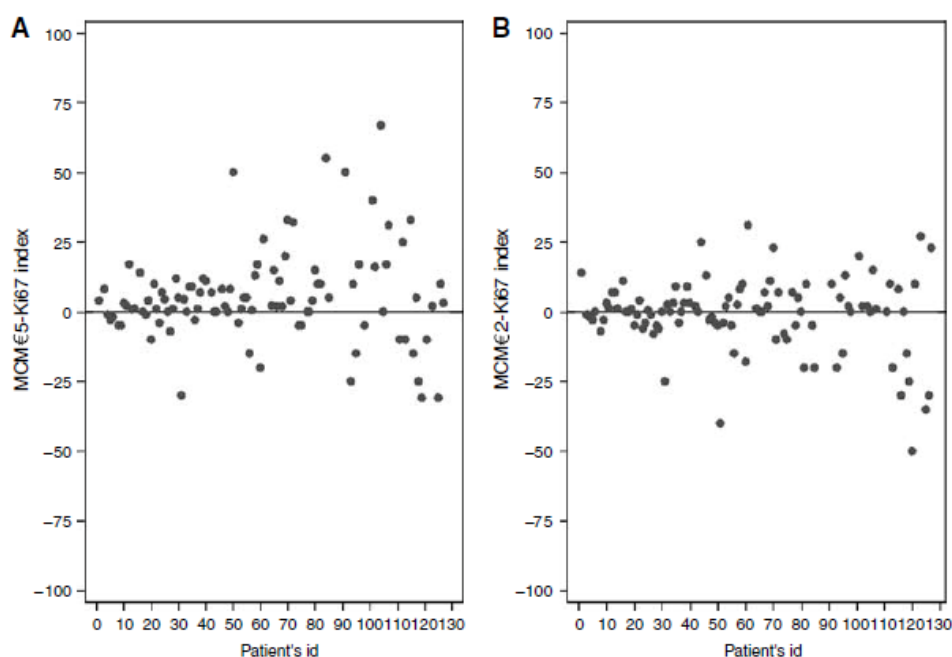
Διάφορες παράμετροι	Έκφραση της RPA2 (%) (διάμεσος τιμή, εύρος)
Ιστολογικός τύπος	
ορώδη	55 (15-95)
βλεννώδη	60 (45-65)
ενδομητριοειδή	62,5 (45-95)
διαυγοκυτταρικά	70 (60-85)
Αδιαφοροποίητα	52,50 (20-80)
	P=0,5645 (df=4)
Βαθμός κακοηθείας	
1	42,5 (35-70)
2	55 (15-95)
3	60 (20-95)
	P=0,2431 (df=2)
Στάδιο κατά FIGO	
II/IIIB	45 (15-95)
IIIC/IV	60 (20-95)
	P=0,0053 (df=1)



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης της RPA2 σε σχέση με το στάδιο κατά FIGO A) Σε όλο το δείγμα και B) στους ορώδεις όγκους.

Σχέση της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 με το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού

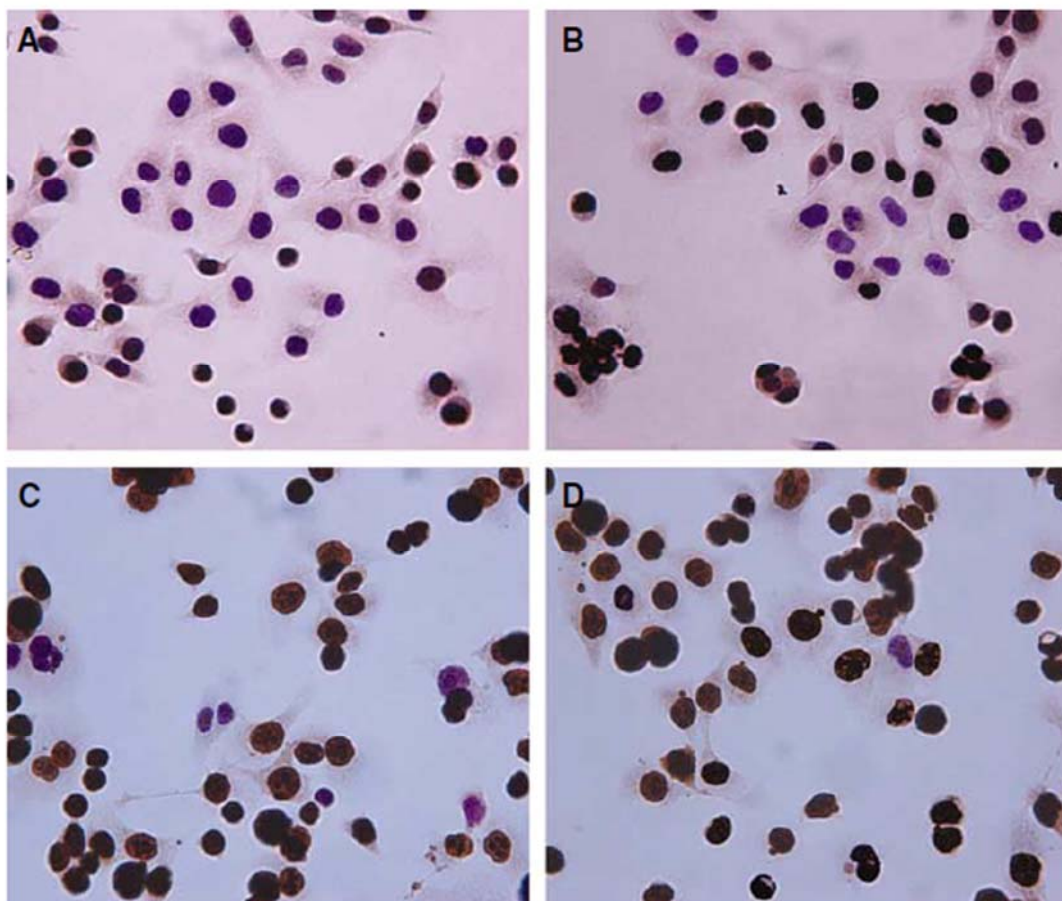
Έντονα θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 και του Ki – 67 (Συντελεστής συσχέτισης Spearman's $\rho = 0,7214$, $p < 0,0001$ και $\rho = 0,6449$, $p < 0,0001$ αντίστοιχα) η οποία παρέμεινε μετά την κατηγοριοποίηση των περιστατικών σε οριακής κακοηθείας ($p < 0,0001$ και $p = 0,0038$ αντίστοιχα) και σε καρκινώματα ($p = 0,0242$ και $p < 0,0001$ αντίστοιχα). Σε αμφότερες τις ομάδες των όγκων οριακής κακοήθειας και αδενοκαρκινωμάτων ο αριθμός θετικών κυττάρων που εκφράζουν MCM-5 φαίνεται να υπερκαλύπτει αριθμητικά εκείνα που εκφράζουν Ki – 67 (Wilcoxon signed-rank κατά ζεύγη $p = 0,0300$ και $p = 0,0206$ αντίστοιχα, εικόνα 12). Μεταξύ των αδενοκαρκινωμάτων στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σύγκριση των επιπέδων MCM-5 και Ki – 67 παρατηρήθηκαν μόνο στα νεοπλάσματα βαθμού κακοήθειας I ($p = 0,0049$).



Εικόνα 12: Γράφημα διασποράς που καταδεικνύει τις διαφορές **A)** μεταξύ της έκφρασης MCM-5 και Ki-67 **(B)** μεταξύ της έκφρασης MCM-2 και Ki-67. Είναι φανερό ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η διαφορά μεταξύ των επιπέδων των MCM-5 και Ki-67 είναι μεγαλύτερη του μηδενός (>0)

Έκφραση των MCM-2, MCM-5 και Ki-67 σε καλλιέργεια κυττάρων MDAH-2774 (εικόνα 13)

Στην ασύγχρονη κυτταροκαλλιέργεια, ένας μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων εκφράζει MCM-2 και MCM-5 παρά Ki-67, με τους αντίστοιχους ποσοστιαίους δείκτες έκφρασης να είναι 95, 98 και 88%, αντίστοιχα (MCM-2 / Ki-67 $P = 0,0759$, MCM-5 / Ki-67 $P = 0.0056$). Αυτή η διαφορά παρέμεινε και έγινε ακόμα μεγαλύτερη στα συγχρονισμένα σε φάση G1 κύτταρα (MCM-2 / Ki67 $P < 0,0001$, MCM-5 / Ki-67 $P = 0.0039$). Οι ποσοστιαίοι δείκτες έκφρασης στην προκειμένη περίπτωση ήταν 79, 70 και 50%, αντίστοιχα, σημαντικά χαμηλότεροι από εκείνους που χαρακτηρίζουν την ασύγχρονη κυτταροκαλλιέργεια (MCM-2 $P = 0,0008$, MCM-5 $P < 0,0001$, Ki-67 $P < 0,0001$).

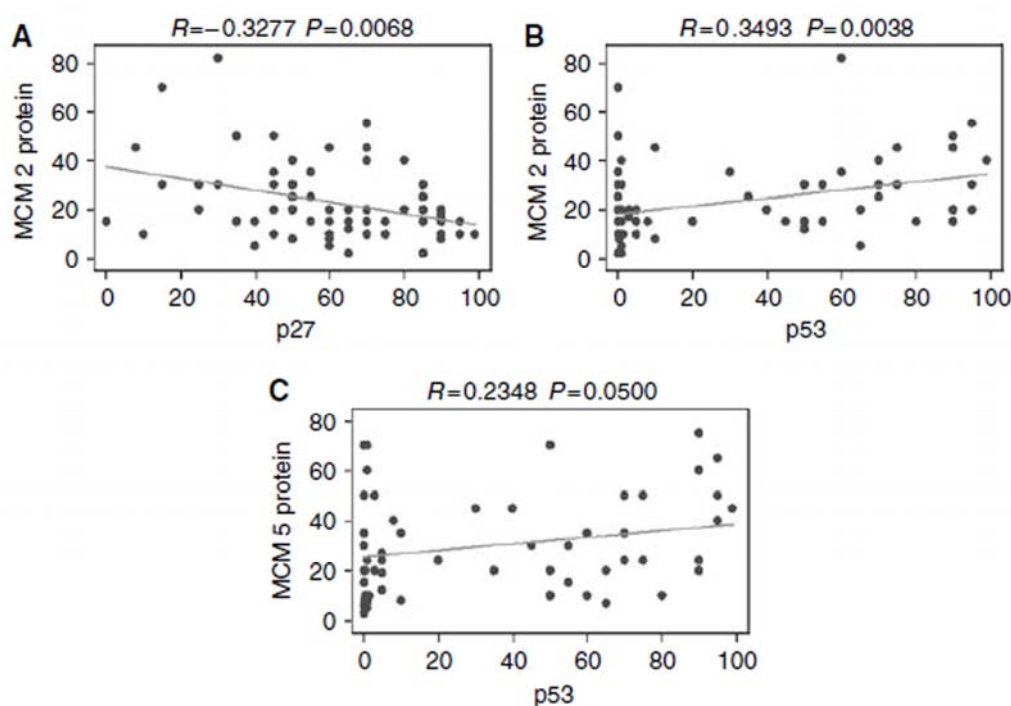


Εικόνα 13: Ανοσοϊστοχημική έκφραση των MCM-5 και Ki-67 σε μια κυτταρική σειρά καρκίνου των ωοθηκών: **(Α)** έκφραση Ki-67 σε ασύγχρονη κυτταροκαλλιέργεια **(Β)** MCM-5 έκφραση σε ασύγχρονη κυτταροκαλλιέργεια **(Γ)** Ki-67 έκφραση σε συγχρονισμένη καλλιέργεια κυττάρων σε φάση G1 **(Δ)** έκφραση MCM-5 σε συγχρονισμένη καλλιέργεια κυττάρων σε φάση G1(X400)

Συσχέτιση της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 με $P27^{Kip1}$, $P21^{WAF1}$, p53 και pRB

Σε όγκους οριακής κακοήθειας, τα επίπεδα των πρωτεϊνών MCM δεν σχετίζονται με την έκφραση των $P27^{Kip1}$, PRB, $p21^{WAF1}$ ή του p53 ($P > 0,10$). Επίσης, σε καρκινώματα των ωοθηκών, καμία σχέση δεν πιστοποιήθηκε μεταξύ των $p21^{WAF1}$ και της έκφρασης των MCM-2 ή MCM-5 ($P > 0,10$). Ωστόσο, υψηλότερα ποσοστά έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 παρατηρήθηκαν σε αδενοκαρκινώματα των ωοθηκών τα οποία εμφανίζουν έκφραση της p53 πρωτεΐνης $> 10\%$ (Kruskal-Wallis ANOVA $p = 0,0022$ και p

0,0300 αντίστοιχα). Στα καρκινώματα, στατιστικά σημαντική αντιστρόφως ανάλογη σχέση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της MCM-2 και της P27^{Kip1} (Συντελεστής συσχέτισης Spearman $\rho = -0,3277$, $p = 0,0068$, εικόνα 16Α). Επίσης, μία στατιστικά σημαντική θετική σχέση προέκυψε μεταξύ της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 και της έκφρασης της p53 (Συντελεστής συσχέτισης Spearman $\rho = 0,3493$, $p = 0,0038$, και $\rho = 0,2348$, $p = 0,0500$, αντίστοιχα, εικόνα 14Β και Γ).



Εικόνα 14: Γράφημα διασποράς που καταδεικνύει τη σχέση μεταξύ της έκφρασης (Α) των MCM-2 και p27 (Β) MCM-2 και p53 (Γ) MCM-5 και p53

Συσχετίσεις της έκφρασης της RPA2 με την έκφραση των MCM-2, MCM-5 και Ki67

Η έκφραση της RPA2 σχετίζεται θετικά με την έκφραση της MCM-2 ($R=0,4340$ και $p=0.0001$) και της MCM-5 ($R=0,9036$ και $p<0.0001$). Οι σχέσεις αυτές παραμένουν στατιστικά σημαντικές όταν η ανάλυση περιορίστηκε στα ορώδη αδενοκαρκινώματα (MCM-2, $R=0,4798$ και $p=0.0001$, MCM-5, $R=0,9209$ και $p<0.0001$). Εντούτοις η ένταση της χρώσης

της RPA2 δεν σχετίζεται με την έκφραση των MCM-2 και MCM-5. Επιπλέον, η έκφραση του Ki-67 δεν σχετίζεται με την έκφραση της RPA2 ($p > 0.10$).

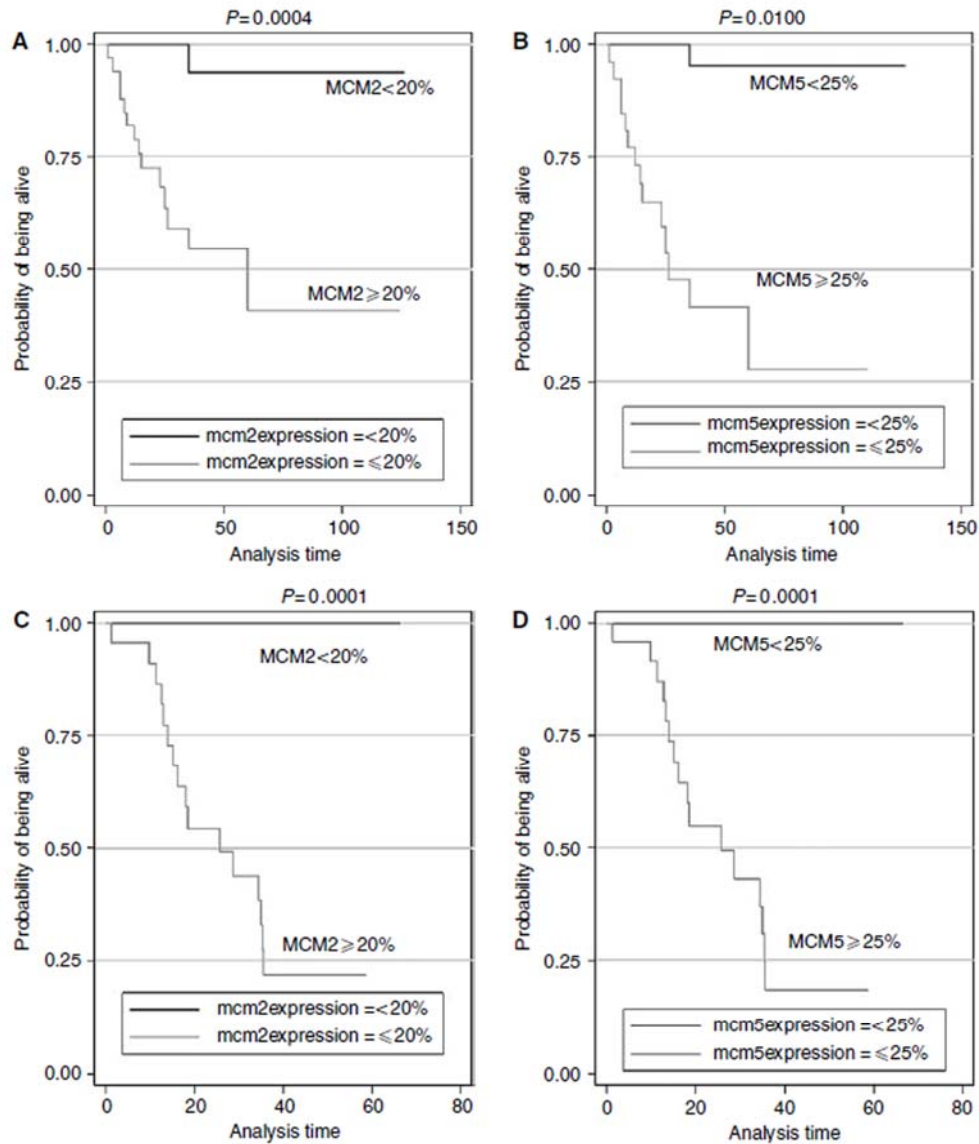
Μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης

Στην μονοπαραγοντική ανάλυση, οι παράμετροι που επηρεάζουν αρνητικά την επιβίωση ήταν ο υψηλός βαθμός κακοήθειας ($P = 0.0330$), το προχωρημένο στάδιο της νόσου ($P = 0.0193$), η παρουσία μαζικής υπολειμματικής νόσου ($P = 0,0001$), η αυξημένη ($\geq 20\%$) έκφραση της MCM-2 ($P = 0,0004$) η αυξημένη ($\geq 25\%$) έκφραση της MCM-5 ($P = 0.0100$) (εικόνα 15A και 15B) και η αυξημένη έκφραση της RPA2 ($\geq 60\%$, $p = 0,0004$) (Εικόνα 16), ενώ ο ιστολογικός τύπος είναι οριακά στατιστικά σημαντικός ως προς το θέμα της επιβίωσης ($P = 0.0900$).

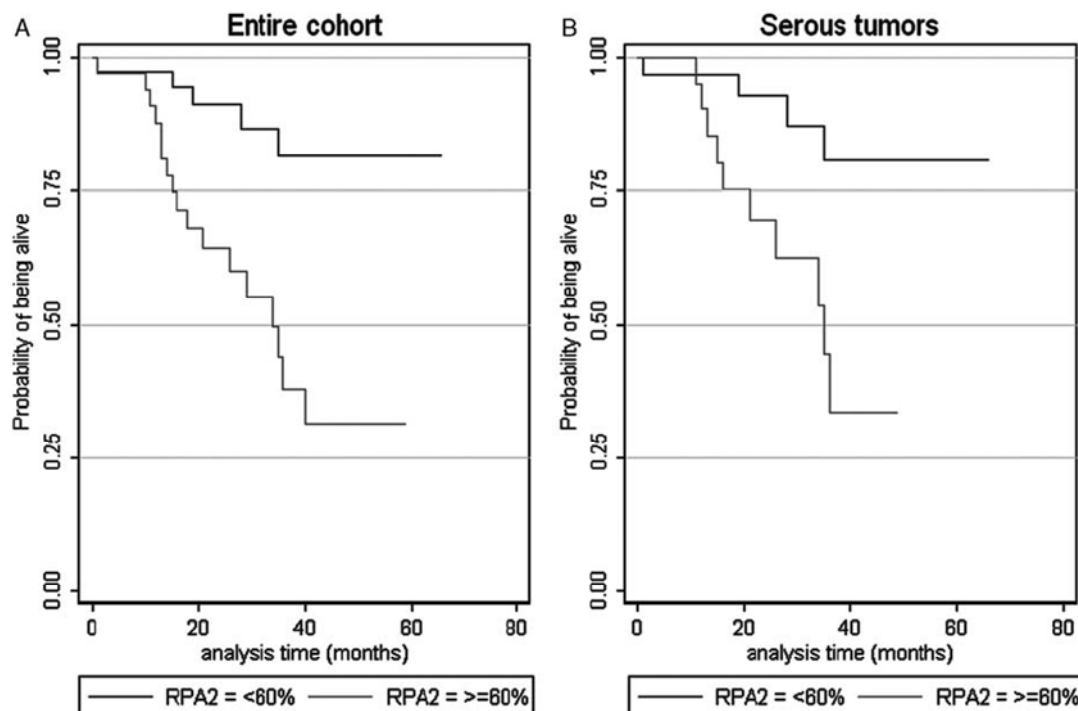
Μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης στην ομάδα ελέγχου

Με βάση τους τύπους που παρουσιάστηκαν ανωτέρω για να ταυτοποιηθεί διαφορά 0,5282 μεταξύ τιμών 0,9357 και 0,4093 που αντιστοίχως αντιπροσωπεύουν την πιθανότητα επιβίωσης στις ομάδες υψηλής ($\geq 20\%$) και χαμηλής έκφρασης MCM-2 ($< 20\%$) μετά από την πάροδο 60 μηνών όπως υπολογίζεται στο υπό διερεύνηση δείγμα ασθενών, με τη χρήση της δοκιμασίας log-rank για την επίτευξη ποιοτικής ισχύος 90% και επιπέδου στατιστικής σημαντικότητας 0,05 απαιτείται δείγμα 42 ασθενών. Αντίστοιχα απαιτείται δείγμα 29 ασθενών για την ανίχνευση της διαφοράς ύψους 0,6745 μεταξύ των τιμών που αντιπροσωπεύουν την πιθανότητα επιβίωσης 0,9524 στις ομάδες υψηλής ($\geq 25\%$) και 0,2779 στην ομάδα χαμηλής έκφρασης MCM-5 ($< 25\%$) μετά από πάροδο 60 μηνών, όπως υπολογίζεται στο υπό διερεύνηση δείγμα ασθενών, με τη χρήση της δοκιμασίας για την επίτευξη στατιστικής ισχύος 90% και επιπέδου στατιστικής σημαντικότητας 0,05. Κατά συνέπεια, το δείγμα ελέγχου 45 ασθενών είναι επαρκές. Στην ομάδα αυτή η συνολική επιβίωση ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με υψηλή έκφραση MCM-2 σε σύγκριση με εκείνη του ομίλου με χαμηλή έκφραση MCM-2 (δοκιμασία log-rank, $p < 0,0001$). Το ίδιο ισχύει και για τους ασθενείς

με υψηλή έκφραση MCM-5 ($\geq 25\%$) (log-rank test, $p < 0,0001$) (εικόνα 15Γ και 15Δ).



Εικόνα 15: Γράφημα καμπύλης Kaplan-Meier που αναπαριστά τη συνολική επιβίωση, σε σχέση με την πρωτεϊνική έκφραση των MCM-2 και MCM-5 σε όλο το δείγμα (**A, B**) όσο και στην ομάδα ελέγχου (**Γ, Δ**).



Εικόνα 16: Καμπύλες Kaplan-Meier της συνολικής επιβίωσης σε σχέση με την έκφραση της RPA2 A) Σε όλο το δείγμα και B) στους ορώδεις όγκους ($p=0,0050$).

Ανάλυση επιβίωσης

Σε όλο το δείγμα

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης κατά Cox, που περιλαμβάνει την έκφραση της MCM-2, τον ιστολογικό τύπο, το στάδιο, το βαθμό διαφοροποίησης, τη χημειοθεραπεία και την παρουσία της υπολειμματικής νόσου, η έκφραση της MCM-2 προέκυψε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης αρνητικής έκβασης της νόσου ($p = 0,001$) σε συνδυασμό με το προηγμένο στάδιο της νόσου (πίνακας 12, μοντέλο A1). Όταν η πολυπαραγοντική ανάλυση επαναλήφθηκε για την MCM-5 και συμπεριλαμβάνει και όλες τις προαναφερόμενες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους η έκφραση της MCM-5 αναδείχθηκε ως μοναδικός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της επιβίωσης ($p = 0,0360$, πίνακας 12, μοντέλο B1). Όταν οι άλλοι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου εισήχθησαν επίσης στα μοντέλα, η MCM-2 παρέμεινε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας (p

<0,0001) σε συνδυασμό με το στάδιο της νόσου και την έκφραση της p21WAF1 (πίνακας 12, μοντέλο A2), ενώ η MCM-5 παρέμεινε ο μόνος ανεξάρτητος δείκτης συνολικής επιβίωσης έναντι όλων των άλλων παραμέτρων που εξετάστηκαν ($P = 0,0220$, πίνακας 12, μοντέλο B2).

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση της συνολικής επιβίωσης, η οποία περιλαμβάνει την έκταση και την ένταση της ανοσοέκφρασης της RPA2, το στάδιο, το βαθμό διαφοροποίησης και τον ιστολογικό τύπο, τα επίπεδα της έκφρασης της RPA2, αναδεικνύονται ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης κακής έκβασης της νόσου ($p < 0.0001$) σε συνδυασμό με το βαθμό διαφοροποίησης του καρκίνου (Πίνακας 12, Μοντέλο C1). Όταν τα επίπεδα έκφρασης των MCM-2, MCM-5 και Ki-67 εισήχθησαν στο μοντέλο, η RPA2 διατηρεί την προγνωστική της αξία ($p = 0.002$), (Πίνακας 12, Μοντέλο C2). Όταν η πραγματοποιηθείσα ανάλυση περιλαμβάνει μόνον τα ορώδη καρκινώματα, η έκφραση RPA2 αποδεικνύεται ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης μειωμένης επιβίωσης ακόμα και μετά την εισαγωγή της έκφρασης των MCM-2, MCM-5 και Ki-67 στο μοντέλο (σχετικός κίνδυνος=9,228, $p = 0.0004$).

Πίνακας 12: Πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης κατά Cox

Παράμετροι	P	Σχετικός κίνδυνος (ΣΚ)	95% όρια αξιοπιστίας του ΣΚ	
A1				
MCM-2	0,001	1,058	1,023	1,093
Στάδιο I/II vs III/IV	0,045	11,6	1,06	117,52
B1				
MCM-5	0,036	1,027	1,001	1,053
A2				
MCM-2	<0,001	1,116	1,049	1,187
p21 ^{WAF1}	0,028	0,621	0,406	0,949
B2				
MCM-5	0,002	1,043	1,006	1,082
C ₁				
RPA ₂	<0,001	10,911	2,924	40,716
Βαθμός διαφοροποίησης	0,025	3,399	1,164	9,922
C ₂				
RPA ₂	0,002	12,447	2,441	63,449
Βαθμός διαφοροποίησης	0,021	3,529	1,206	10,325

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, σαφώς δείχνουμε τον πυρηνικό εντοπισμό των πρωτεϊνών MCM-2 και MCM-5 στα νεοπλάσματα των ωοθηκών. Μια αμυδρή κυτταροπλασματική χρώση παρατηρήθηκε επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά δεν ελήφθη υπόψη στη στατιστική ανάλυση, σύμφωνα και με προηγούμενες παρατηρήσεις σε ουροθηλιακά και προστατικά καρκινώματα [60,75]. Μελέτες στο σακχαρομύκητα τεκμηριώνουν την κατανομή των πρωτεϊνών MCM-2 και MCM-3 τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και τον πυρήνα σε σχετικά σταθερά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [117]. Ωστόσο, περίπου το 5-10% των πρωτεϊνών αυτών ήταν στενά συνδεδεμένες με χρωματίνη από την πρόιμη φάση G1 έως την αρχή της φάσης S, όταν πραγματοποιείται η έναρξη της αντιγραφής, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ενεργό σύμπλεγμα MCM είναι πιθανό να εντοπίζεται στη χρωματίνη [48]. Η πυρηνική εντόπιση και η ενζυματική δραστηριότητα όμως δεν είναι συνώνυμοι όροι καθώς η πυρηνική MCM είναι μη δεσμευμένη στη χρωματίνη στη φάση G2 [117].

Μια στατιστικά σημαντική θετική σχέση τεκμηριώθηκε μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των MCM-2 και MCM-5 γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο πρωτεΐνες δημιουργούν ένα λειτουργικό σύμπλεγμα. Στο πλαίσιο αυτό, διάφορες μέθοδοι έχουν τεκμηριώσει ότι υφίστανται φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της οικογένειας MCM στον άνθρωπο και σε άλλους οργανισμούς [90]. Έτσι, ανοσοκατακρήμνιση μίας εκ των πρωτεϊνών MCM συχνά οδηγεί στην συγκατακρήμνιση και των έξι μελών της οικογένειας MCM [62,112]. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης σε κύτταρα HeLa, κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S δείχνει ότι οι έξι πρωτεΐνες MCM συνεντοπίζονται σε κοινά τμήματα DNA μέσου μεγέθους 500 βάσεων, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στην χρωματίνη ως πολυμερές σύμπλεγμα που περιέχει και τις έξι υπομονάδες [91].

Δεδομένου ότι οι MCM πρωτεΐνες διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη της σύνθεσης του DNA καθώς και ότι η αντιγραφή του DNA

πρέπει να προηγείται κάθε κυτταρικής διαίρεσης, η έκφρασή τους θα πρέπει να συσχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Με αυτό το σκεπτικό τα στοιχεία μας αναδεικνύουν την αξία της πρωτεϊνικής έκφρασης των MCM ως νέου δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού [26]. Πράγματι, στη μελέτη μας, προέκυψαν ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των ποσοστών έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67, μία σχέση που παρέμεινε ακόμη και μετά το διαχωρισμό των περιπτώσεων μας σε οριακής κακοηθείας και σε καρκινώματα. Η αντίστοιχη μελέτη μιας κυτταρικής σειράς καρκίνου των ωοθηκών που μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά και με ανοσοφθορισμό έναντι των MCM-2, MCM-5 και Ki-67 επαλήθευσε ότι τα κύτταρα που εκφράζουν MCM (και ειδικότερα MCM-5) υπερτερούν αριθμητικά από τα κύτταρα που εκφράζουν Ki-67 σε ασυγχρόνιστες καλλιέργειες (98 έναντι 88%) ενώ η διαφορά αυτή έγινε ακόμα μεγαλύτερη σε κύτταρα συγχρονισμένα σε φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (79 έναντι 55%). Ωστόσο, και σύμφωνα με προηγούμενες παρατηρήσεις που έγιναν σε διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα [60], οι μέσες τιμές MCM-5 σε καρκινώματα των ωοθηκών καθώς και στους οριακής κακοήθειας όγκους ήταν σημαντικά υψηλότερες από εκείνες του Ki-67. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι MCM πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν έναν δυνητικά ακριβέστερο τρόπο προσδιορισμού του κλάσματος πολλαπλασιασμού μέσα σε έναν όγκο από ό,τι ο συμβατικός δείκτης πολλαπλασιασμού Ki-67 πιθανώς επειδή ο τελευταίος δεν σημαίνει ότι τα κύτταρα που τον εκφράζουν βρίσκονται στις αρχές της φάσης G1 [83,60,97]. Ωστόσο, η διαφορά μεταξύ των ποσοστών έκφρασης των MCM και του Ki-67 θα μπορούσε να είναι μια αντανάκλαση του γεγονότος ότι το Ki-67 αποσιωπείται νωρίς κατά τη διαφοροποίηση ενώ τα επίπεδα των MCM καταστέλλονται πολύ αργότερα, όταν τα κύτταρα υιοθετούν έναν τελικά διαφοροποιημένο φαινότυπο [25,54]. Έτσι, η «βελτιωμένη» ευαισθησία των MCM ως δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός της ταυτοποίησης των διαφοροποιημένων κυττάρων, η οποία συνάδει με τα ευρήματά μας ότι η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ MCM-5 και Ki-67 καταγράφεται στα πλαίσια

των όγκων οριακού βαθμού κακοήθειας (δηλαδή μεταξύ των πολύ καλά διαφοροποιημένων όγκων). Ως εκ τούτου, οι MCM πρωτεΐνες ταυτοποιούν ένα μεγαλύτερο κυτταρικό κλάσμα ευρισκόμενο σε φάση πολλαπλασιασμού, γεγονός που μπορεί να προκύπτει είτε α) από το γεγονός ότι η έκφραση των MCM προσδιορίζει όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, σε αντίθεση με το Ki-67 που εκφράζεται χαμηλά στις αρχές της φάσης G1 και στην M, ή β) από στην διαφορετική κινητική της καταστολής των MCM και του Ki-67 κατά την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο προς τη διαφοροποιημένη κατάσταση.

Κατά την πρώιμη φάση G1, οι παράγοντες σύνδεσης των MCM, Cdc6 και Cdt1 στρατολογούν τις πρωτεΐνες MCM στη χρωματίνη κοντά στα σημεία έναρξης της αντιγραφής, όπου παραμένουν συγκεντρωμένες μέχρι το τέλος της φάσης G1. Η φάση S τότε πυροδοτείται από τα υψηλά επίπεδα κυκλίνης A/Cdk2 και Dbf4/Cdc7 που ενεργοποιούν το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών MCM και χρωματίνης [2]. Από την άλλη πλευρά, στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς, το P27^{Kip1} ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αναστέλλοντας τις CDKs [96]. Έτσι, το γεγονός ότι σε αυτή τη μελέτη βρίσκουμε πως τα P27^{Kip1} και η MCM-2 είναι αντιστρόφως ανάλογα σχετιζόμενες συμφωνεί με τον υποκείμενο μηχανισμό της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Αν και ο παράγων p21^{WAF1} αποτελεί επίσης ένα αναστολέα των CDK, δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών έκφρασης των p21^{WAF1} και MCM-2 /MCM-5. Ωστόσο, η ανασταλτική λειτουργία του p21^{WAF1} στην σύνθεση του DNA απαιτεί το σχηματισμό ενός τεταρτοταγούς συμπλέγματος που αποτελείται από κυκλίνες, CDKs και PCNA το οποίο θεωρείται ότι ρυθμίζεται στοιχειομετρικά. Εντούτοις, η στοιχειομετρική αυτή ρύθμιση ασκείται μόνον όταν το p21^{WAF1} είναι σε μοριακή περίσσεια: αν η αναλογία του p21^{WAF1} προς τα μόρια των CDK είναι μικρότερη του ενός προς ένα, το p21^{WAF1} χρησιμεύει αντίθετα ως παράγοντας συναρμολόγησης του συμπλέγματος CDK και δεν αναστέλλει την δραστηριότητα των CDK.

Στους οριακής κακοήθειας όγκους τα επίπεδα των πρωτεϊνών MCM δεν σχετίζονται ούτε με την P27^{Kip1} ούτε με την P21^{WAF1} σύμφωνα και με τις

προηγούμενες παρατηρήσεις μας σχετικά με την έκφραση των Ki-67, p21^{WAF1} p27^{Kip1} στους όγκους αυτούς [59,120]. Οι Palazzo και συνεργάτες σημειώνουν μια αντίστοιχη έλλειψη σχέσης μεταξύ του ρυθμού πολλαπλασιασμού και των επιπέδων του p21^{WAF1} στους οριακής κακοήθειας όγκους. Οι συγγραφείς στην εργασία αυτή υποστηρίζουν ότι αυτό το εύρημα ήταν αναμενόμενο σε όγκους με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, σε φυσιολογικούς ιστούς καθώς και σε καλοήθεις όγκους. Τα χαμηλά επίπεδα του Ki-67 στους όγκους αυτούς μπορεί να υποδεικνύουν ότι τα περισσότερα κύτταρα εξακολουθούν να είναι σε θέση να παρακάμψουν τον κυτταρικό κύκλο και να εισαχθούν σε φάση G0, σε αντίθεση με τους κακοήθεις όγκους. Σύμφωνα με αυτήν την επιχειρηματολογία, αυτή η ερευνητική ομάδα απέδωσε την έλλειψη p21^{WAF1} στα εν ηρεμία κύτταρα στην πρωτεόλυση της πρωτεΐνης p21^{WAF1}, όταν το κύτταρο εξέρχεται του κυτταρικού κύκλου [85].

Δεδομένου ότι η ανοσοέκφραση της p53 σε καρκινώματα πλέον έχει θεωρηθεί ως υποκατάστατος δείκτης, αν και καθεαυτή η έκφραση της p53 δεν αποτελεί απόδειξη γονιδιακής μετάλλαξης ή αδρανοποίησης αυτής της πρωτεΐνης, οι παρατηρούμενες συσχετίσεις μεταξύ των MCM-2 ή MCM-5, αφενός, και της p53 αφετέρου, μπορεί όντως να είναι ενδεικτικές μίας θετικής επίδρασης που ασκείται από τον μεταλλαγμένο τύπο του p53 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η άποψη ενισχύεται από το γεγονός ότι τα υψηλότερα ποσοστά έκφρασης MCM-2 και MCM-5 παρατηρήθηκαν σε 32 (47,8% των περιπτώσεων) αδενοκαρκινώματα ωοθηκών τα οποία εμφανίζουν έκφραση της p53 μεγαλύτερη του 10%: αυτή η οριζόμενη ως κατώτερη τιμή του 10% στην έκφραση της p53 έχει βρεθεί πως ταυτοποιεί αποτελεσματικά τις μεταλλάξεις του p53 στις ανοσο-ιστοχημικές χρώσεις [6]. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, οι εκτιμήσεις για την συχνότητα (διείσδυση) της μεταλλαγμένης p53 ήταν 45, 5 και 1%, αντίστοιχα, στους διηθητικούς όγκους, τους οριακής κακοήθειας όγκους και τους καλοήθεις όγκους των ωοθηκών [55]. Σε αντίθεση με τα καρκινώματα, δεν τεκμηριώθηκε καμία σχέση μεταξύ του p53 και των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους οριακής κακοήθειας όγκους.

Αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών MCM-2 και MCM-5 κατεδείχθη στα αδενοκαρκινώματα των ωοθηκών, σε σχέση με τους οριακής κακοήθειας όγκους. Αυτές οι διαφορές παρέμειναν σημαντικές, όταν τα ορώδη και βλεννώδη νεοπλάσματα εξετάστηκαν χωριστά. Επιπλέον, δεν υπήρχε διαφορά, μεταξύ ορώδων και βλεννώδων οριακής κακοήθειας όγκων ως προς την έκφραση των MCM, ενώ στα πτωχά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα, παρατηρήθηκε υψηλότερο επίπεδο της έκφρασης της MCM-5 σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ιστολογικούς τύπους. Ωστόσο, το γεγονός ότι αυτή η σχέση δεν διατηρεί την στατιστική σημαντικότητά της όταν τα πτωχά διαφοροποιημένα νεοπλάσματα εξαιρέθηκαν από αυτή την ανάλυση, θα μπορούσε πιθανώς να αντανakλά την σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού διαφοροποίησης και της έκφρασης της πρωτεΐνης MCM-5, δεδομένου ότι οι πτωχά διαφοροποιημένοι όγκοι θεωρούνται υψηλής κακοηθείας. Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν και επεκτείνουν την αναφερόμενη αύξηση της έκφρασης της MCM-2 κατά την ογκογένεση του ωοθηκικού καρκίνου [99]. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά, τα γονίδια MCM έχουν βρεθεί επίσης να υπερεκφράζονται σε πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών ως προς τα επίπεδα mRNA τους σε μια σειρά από κακοήθειες [80,94,125]. Καμία συγκεκριμένη πρωτεΐνη MCM δεν φαίνεται να υπερεκφράζεται μόνη της, αποτέλεσμα το οποίο συμφωνεί με τη λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών στα πλαίσια ενός ετεροεξαμερούς συμπλέγματος [108].

Στα αδενοκαρκινώματα των ωοθηκών η έκφραση των MCM-2 και MCM-5 αυξάνεται με την αύξηση του βαθμού κακοήθειας, του σταδίου και της παρουσίας μαζικής υπολειμματικής νόσου. Σημαντική συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης της MCM και του υψηλού βαθμού κακοήθειας έχει περιγραφεί στα προστατικά [75], ουροθηλιακά [60] και νεφρικά καρκινώματα [93], καθώς και σε ολιγοδενδρογλοιώματα [124]. Επιπλέον, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει σαφώς μια δραματική μείωση των επιπέδων του mRNA της MCM-2 καθώς και της πρωτεΐνης MCM-3 κατά τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων μυελοβλαστικών κυττάρων HL60 αντίστοιχως, η οποία συνάδει με τα παρόντα ευρήματά μας [78,87]. Σχετική με το θέμα αυτό είναι η

παρατήρηση ότι η υπερέκφραση των p21^{WAF1} και P27^{Kip1} στην προμυελοκυτταρική λευχαιμική κυτταρική σειρά επιταχύνει τη διαφοροποίησης της [122,127].

Στην παρούσα διατριβή έχουμε σαφώς καταδείξει την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης RPA2 σε ωοθηκικά καρκινώματα. Η παρατηρούμενη πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης RPA2 συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σε καρκινώματα παχέος εντέρου [36], μαστού [116], ουροθηλιακά καρκινώματα ουροδόχου κύστεως [70] καθώς και σε αστροκυτώματα [50]. Επιπλέον η έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 περιορίστηκε μόνο στα νεοπλασματικά και όχι στα φυσιολογικά κύτταρα της ωοθήκης, εύρημα το οποίο καθιστά την πρωτεΐνη RPA2 πιθανή υποψήφια για την συμμετοχή στην παθογένεση των κακοήθων όγκων των ωοθηκών. Όμως οι υποκείμενοι μηχανισμοί οι οποίοι συμβάλουν στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης RPA2 στα ωοθηκικά καρκινώματα είναι ακόμα άγνωστοι.

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας η έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 είχε θετική συσχέτιση με την έκφραση των πρωτεϊνών MCM-2 και MCM-5. Το εύρημα αυτό είναι αναμενόμενο, επειδή είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες RPA και MCM διαδραματίζουν συνεργατικό ρόλο στην έναρξη της αντιγραφής του DNA και ενεργοποιούνται συλλογικά για να φέρουν σε πέρας τον πιθανό τους ρόλο στην αντιγραφή του DNA. Σε αυτό το πλαίσιο προηγούμενες έρευνες έχουν καταδείξει ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών RPA με το σύμπλεγμα αναγνώρισης του σημείου έναρξης της αντιγραφής του DNA (ORC), απαιτεί τις κυκλινο-εξαρτώμενες και τις Ddf4/Cdc7-εξαρτώμενες κινάσες καθώς και τις πρωτεΐνες MCM. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά αναφέρεται ότι η μετάλλαξη της πρωτεΐνης MCM-5 επηρεάζει το φόρτωμα των RPA σε μερικά σημεία έναρξης της αντιγραφής, μία παρατήρηση η οποία επιβεβαιώθηκε με πειράματα κυτταρομετρίας ροής (FACS). Επιπλέον διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών RPA ήταν υψηλότερα στα καρκινώματα σταδίων IIC/IV σε σύγκριση με εκείνα των σταδίων II/IIIB, σε όλο το δείγμα και στους

ορώδεις όγκους. Αυτό το εύρημα δεν είναι εντελώς αναπάντεχο επειδή η έκφραση της RPA2 στη μελέτη μας σχετίζεται θετικά με την ανοσοέκφραση των MCM-2 και MCM-5 η οποία όπως είδαμε επικρατεί στις πιο επιθετικές μορφές. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν τις συνεργικές λειτουργίες αυτών των μορίων στα ωοθηκικά καρκινώματα, και εγείρουν την υπόθεση ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη αυτών των όγκων. Επιπλέον πρέπει να σημειωθεί ότι με τη χρήση λογαριθμικής πολυπαραγοντικής ανάλυσης διασποράς αναδείξαμε την ανεξαρτησία της σχέσης της πρωτεΐνης RPA2 με το στάδιο του όγκου από την έκφραση των πρωτεϊνών MCM. Επιπλέον η έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 ήταν ανεξάρτητη του δείκτη Ki-67, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη RPA2 δεν είναι απλά ένας δείκτης πολλαπλασιασμού. Αυτά τα αποτελέσματα επιπλέον υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη RPA2 σχετίζεται με την εκδήλωση ενός επιθετικότερου φαινό-τυπου.

Ένας από τους κύριους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί για πρώτη φορά η προγνωστική σημασία της έκφρασης των MCM-2, MCM-5 και RPA2 στα αδενοκαρκινώματα των ωοθηκών. Και στη μονοπαραγοντική και στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης, η υπερ-έκφραση της κάθε πρωτεΐνης σχετίζεται σημαντικά με την πτωχή πρόγνωση για την επιβίωση των ασθενών. Είναι σημαντικό ότι τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής ανάλυσης επιβίωσης για την MCM2 και την MCM5 επικυρώθηκαν σε ένα ανεξάρτητο σύνολο των ασθενών. Η επιβεβαίωση της προγνωστικής αξίας μιας παγκοσμίως αποδεκτής ομάδας προγνωστικών παραγόντων (βαθμός διαφοροποίησης, έκταση υπολειμματικής νόσου στάδιο) αποδεικνύει ότι το δείγμα μας ήταν αρκετά αντιπροσωπευτικό και η ανάλυση επιβίωσης ήταν έγκυρη.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες και αναλύσεις μικροσυστοιχιών έκφρασης έχουν προσδιορίσει ανεξάρτητα τις πρωτεΐνες MCM ως δυναμικούς δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης σε διάφορους τύπους καρκίνου [59, 93,120, 80,94,125, 38,40,45,51,57,61,88,102,104,118]. Τα γονίδια MCM έχουν επίσης εμφα-

νιστεί ως μέρος μίας «κακής» προγνωστικής υπογραφής του καρκίνου του μαστού [125,104,118], του λεμφώματος μανδύα [94] και του μυελοβλαστώματος [80], ενώ σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας η έκφραση των πρωτεϊνών MCM φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη ως προγνωστικός δείκτης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με ακτινοβολία [77].

Πιθανόν το πιο ενδιαφέρον εύρημα αυτής της έρευνας βρίσκεται στο γεγονός ότι η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 συνδέθηκε με πτωχή συνολική επιβίωση, ένα εύρημα το οποίο επαναλήφθηκε στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης όπου ακόμη και όταν τα επίπεδα έκφρασης των MCM-2, MCM-5, και Ki-67 εισήχθησαν στο μοντέλο. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει ξεχωριστά την έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 σαν έναν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα σε διάφορους τύπους όγκων [36,50,70]. Ο αρνητικός προγνωστικός ρόλος της έκφρασης της πρωτεΐνης RPA2, ο οποίος κατεδείχθη από την παρούσα μελέτη συμπορεύεται με πρόσφατες παρατηρήσεις σε καρκίνους παχέος εντέρου και σε διάχυτα αστροκυττώματα, που έχουν προηγουμένως μελετηθεί από την ομάδα μας [36,50,70].

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί που μπορεί να εμπλέκονται στην συμμετοχή της πρωτεΐνης RPA2 στην καρκινογένεση των επιθηλιακών όγκων της ωοθήκης και στους οποίους μπορεί να οφείλεται η προγνωστική της αξία σε αυτούς τους όγκους παραμένουν ασαφείς. Σε αυτό το πλαίσιο, πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην φωσφορυλίωση της υπομονάδας RPA2 και στις πιθανές επιπτώσεις αυτής της αλλαγής κατά την πραγματοποίηση των διαφορετικών της λειτουργιών. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η RPA2 είναι φωσφορυλιωμένη σε δύο διαφορετικά κατάλοιπα σερίνης κατά την διάρκεια της μίτωσης από τα συμπλέγματα κυκλίνης B-Cdk [37]. Επίσης έχει πρόσφατα προταθεί, ότι υπό την επίδραση ισχυρού αντιγραφικού στρέψ, μία ατελής φωσφορυλίωση της RPA2 μπορεί να διεγείρει ποικίλα μεταλλαξιγόνα γεγονότα και τελικά να οδηγήσει σε ανευπλοειδία προκαλώντας αυξημένη γενετική αστάθεια [121].

Σε αυτό το πλαίσιο η φωσφορυλιωμένη RPA2 η οποία σχηματίζεται υπό συνθήκες αντιγραφικού στρες ενεργοποιεί τη σύνθεση του DNA ενώ, επί απουσίας μίας τέτοιας φωσφορυλίωσης, ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού φαίνεται να μειώνεται.

Η δυσμενής προγνωστική αξία της έκφρασης της πρωτεΐνης RPA2 σε ωοθηκικά αδενοκαρκινώματα απαιτεί περισσότερες έρευνες κυρίως λόγω του πρόσφατα αναγνωρισμένου ρόλου των πρωτεϊνών RPA σαν πιθανού στόχου χημειοθεραπείας των καρκίνων. Πιο ειδικά, μία πρόσφατη έρευνα κατέδειξε μία νέα ουσία (ονομαζόμενη TDRL-505) η οποία αναχαιτίζει *in vitro* την ικανότητα της RPA να δεσμεύεται στην μονή έλικα του DNA, να αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, να προκαλεί κυτταροτοξικότητα και να αυξάνει την αποτελεσματικότητα των υπό έρευνα χημειοθεραπευτικών παραγόντων των οποίων η λειτουργική βάση έγκειται στο να προκαλούν βλάβη στο DNA (όπως η cisplatin και το etoposide) [7].

Εν κατακλείδι, στην παρούσα μελέτη, ερευνήσαμε για πρώτη φορά την έκφραση των MCM-2 και MCM-5 σε οριακής κακοήθειας όγκους και σε αδενοκαρκινώματα των ωοθηκών σε σχέση με κλινικο-παθολογοανατομικές παραμέτρους, με ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και την επιβίωση των ασθενών. Και οι δύο πρωτεΐνες σχετίζονται σημαντικά με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας, το προχωρημένο στάδιο και την υπολειμματική νόσο καθώς και με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67. Η έκφραση της MCM-2 ήταν αντιστρόφως ανάλογη με αυτήν του αναστολέα των CDK P27^{Kip1}, ενώ και οι δύο πρωτεΐνες MCM συσχετίζονται θετικά με την έκφραση της p53 σε καρκινώματα.

Ακόμη στην παρούσα έρευνα παρουσιάζουμε στοιχεία για την θετική συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης RPA2 στους ωοθηκικούς καρκίνους με το στάδιο της νόσου κατά FIGO, γεγονός το οποίο εμπλέκει αυτό το μόριο στην εκδήλωση ενός επιθετικότερου φαινότυπου σε αυτούς τους όγκους. Επιπρόσθετα η ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών RPA2 και MCM-2 και MCM-5 που βρήκαμε υποδεικνύει τον

παράλληλο ρόλο αυτών των μορίων στην έναρξη της αντιγραφής του DNA σε αυτούς τους όγκους, ενώ η απουσία συσχέτισης με τον δείκτη Ki-67 έρχεται σε αντίθεση με την άποψη ότι η RPA2 είναι απλά ένας δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Βάσει των ανωτέρω διαπιστώσεων εγείρεται η δελεαστική πιθανότητα που σίγουρα αξίζει προσοχής της στοχοποίησης των MCM πρωτεϊνών και των ρυθμιστών τους ως μέρος των αντικαρκινικών θεραπειών που παρεμβαίνουν στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Επίσης η έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 μπορεί να περιληφθεί στο οπλοστάσιό μας των μοριακών δεικτών των ωοθηκικών καρκινωμάτων για να βελτιώσει την προγνωστική πληροφορία που προκύπτει από τις αποδεκτές παραμέτρους και να προάγει περαιτέρω έρευνες με σκοπό την ανεύρεση νέων θεραπευτικών παραγόντων που να αναστέλλουν την δραστηριότητα της RPA. Μελλοντικές έρευνες θα κατευθυνθούν στο να αξιολογήσουν το ρόλο της πρωτεΐνης RPA2 σαν προγνωστικό παράγοντα και σαν θεραπευτικό στόχο στα ωοθηκικά αδενοκαρκινώματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος συντήρησης μινι-χρωμοσωμάτων (MCM) εμφανίστηκαν πρόσφατα ως νέοι προγνωστικοί δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διάφορους τύπους καρκίνου. Επίσης η αντιγραφική πρωτεΐνη A (RPA) προσδένεται σε μονόκλωνο DNA και απαιτείται τόσο για την έναρξη της αντιγραφής του DNA όσο και για τη σταθεροποίηση των μονόκλωνων περιοχών DNA. Έχει προταθεί ότι η συνεργασία αυτής της πρωτεΐνης με αρκετά άλλα μόρια όπως για παράδειγμα το σύμπλεγμα διατήρησης των μινι-χρωμοσωμάτων 2-7 (MCM 2-7), είναι αναγκαία για να διαμεσολαβήσει τις πολύπλοκες λειτουργίες της μέσα στο κύτταρο. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που ερευνά την ανοσο-ιστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών MCM-2, MCM-5 και RPA2 σε μια σειρά από 161 ασθενείς με αδеноκαρκινώματα των ωοθηκών και 43 ασθενείς με χαμηλού κακοήθους δυναμικού (LMP) όγκους, που έχει στόχο να προσδιορίσει τις πιθανές συσχετίσεις αυτών των μορίων με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, τον κλασσικό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki-67), ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (όπως p53, P27^{Kip1}, WAF1 p21 και pRB) και την επιβίωση των ασθενών. Στα 173 περιστατικά μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των MCM-2 και MCM-5 και στα 76 η έκφραση της RPA2. Η ανάλυση επιβίωσης περιορίστηκε μόνο στα αδеноκαρκινώματα. Η διάμεση έκφραση των MCM-2 και MCM-5 (LIs) ήταν σημαντικά υψηλότερη στα αδеноκαρκινώματα σε σύγκριση με τους όγκους LMP ($p < 0,0001$ και στις δύο περιπτώσεις). Σε αδеноκαρκινώματα, τα επίπεδα της MCM-2 και MCM-5 αυξάνονται σημαντικά με το στάδιο του όγκου ($p = 0,0052$ και $p = 0,0180$, αντίστοιχα), με την αύξηση του βαθμού κακοηθείας του όγκου ($p = 0,0002$ και $p = 0,0006$, αντίστοιχα) και την παρουσία υπολειμματικής νόσου ($p < 0,0001$ και στις δύο σχέσεις). Ισχυρά θετικές συσχετίσεις ανευρέθησαν μεταξύ των MCM-2 ή MCM-5 με τα επίπεδα έκφρασης των Ki-67 LI ($p < 0,0001$) καθώς και της πρωτεΐνης p53 ($p = 0,0038$ και $p = 0,0500$, αντίστοιχα). Επιπλέον η έκφραση του MCM-2 σχετίζεται αντίστροφα με το P27^{Kip-1}

($p = 0.0068$). Η έκφραση της πρωτεΐνης RPA2 παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ενώ η ένταση της χρώσης ποικίλει από αχνή έως έντονη. Η έκφραση της RPA2 σχετίζεται με το στάδιο του όγκου σε όλο το δείγμα και στα ορώδη καρκινώματα ($p=0.0053$ και στις δύο συσχετίσεις). Επιπρόσθετα, η ανοσοέκφραση της RPA2 συσχετίζεται θετικά με την έκφραση των MCM-2 ($p=0.0001$) και MCM-5 ($p<0.0001$) αλλά δεν συσχετίζεται με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67 ($p>0.10$). Τόσο η MCM-2 όσο και η MCM-5 σχετίζονται σημαντικά με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών στη μονοπαραγοντική ($\geq 20\%$ vs $> 20\%$, $p = 0,0011$ και $\geq 25\%$ vs $<25\%$, $p = 0,0100$, αντίστοιχα) και στην πολυπαραγοντική ($p = 0,0001$ και $0,0090$ αντίστοιχα) ανάλυση επιβίωσης. Ένα υποσύνολο 45 ασθενών χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση των αποτελεσμάτων μας που αφορούν στα MCM-2 και MCM-5 στην μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης. Στην ομάδα αυτή η έκφραση των MCM-2 και MCM-5 διατηρεί την προγνωστική της αξία ($p < 0,0001$ και στις δύο συσχετίσεις). Η υπερέκφραση της RPA2 πρωτεΐνης αναδεικνύεται ως δυσμενής δείκτης τόσο στην μονοπαραγοντική όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης σε συνδυασμό με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Η RPA2 παρέμεινε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης δυσμενούς επιβίωσης ακόμα και μετά την εισαγωγή στο μοντέλο της έκφρασης των MCM-2 και MCM-5 αλλά και όταν η ανάλυση περιορίστηκε στα ορώδη καρκινώματα ($p=0.004$). Συμπερασματικά τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν τη σχέση της πρωτεΐνης RPA2 με τις MCM-2 και MCM-5 σε αδενοκαρκινώματα ωοθηκών. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη RPA-2 αλλά και οι MCM-2 και MCM-5 φαίνεται να διαδραματίζουν ένα ρόλο στην καρκινογένεση των ωοθηκών και θα μπορούσαν να εξυπηρετήσουν ως χρήσιμοι μοριακοί δείκτες για την κατηγοριοποίηση των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών σε συνάρτηση με την πρόγνωση.

SUMMARY

Minichromosome maintenance proteins (MCM) have recently emerged as novel proliferation markers with prognostic implications in several tumour types. Also replication protein A (RPA) is an ssDNA-binding protein required for the initiation of DNA replication and the stabilization of ssDNA. Collaboration with several molecules, that is, the MCM2-7 complex, has been suggested to be imperative for its multifaceted role. This is the first study investigating MCM-2, MCM-5 and RPA2 immunohistochemical expression in a series of 161 patients with ovarian adenocarcinomas (OC) and 43 patients with low malignant potential (LMP) tumours aiming to determine possible associations with clinicopathological parameters, the conventional proliferation index Ki-67, cell cycle regulators (p53, p27Kip1, p21WAF1 and pRb) and patients' outcome. Immunohistochemistry for MCM-2 and MCM-5 was applied in a series of 171 cases of ovarian LMP tumours and adenocarcinomas, whereas RPA2 was investigated in 76 adenocarcinomas. Survival analysis was restricted to adenocarcinomas. The median MCM-2 and MCM-5 labelling indices (LIs) were significantly higher in adenocarcinomas compared to LMP tumours ($P<0.0001$ for both associations). In adenocarcinomas, the levels of MCM-2 and MCM-5 increased significantly with advancing tumour stage ($P=0.0052$ and $P=0.0180$, respectively), whereas both MCM-2 and MCM-5 increased significantly with increasing tumour grade ($P=0.0002$ and $P=0.0006$, respectively) and the presence of bulky residual disease ($P<0.0001$ in both relationships). A strong positive correlation was established between MCM-2 or MCM-5 expression level and Ki-67 LI ($P<0.0001$) as well as p53 protein ($P=0.0038$ and $P=0.0500$, respectively). Moreover, MCM-2 LI was inversely correlated with p27^{Kip-1} LI ($P=0.0068$). RPA2 protein expression was observed in all cases, whereas the staining intensity varied from weak to strong. RPA2 expression was correlated with the tumor stage in the entire cohort and in serous tumors ($P=0.0053$ in both relationships). Moreover, RPA2 immunoexpression was positively correlated

with MCM-2 ($P=0.0001$) and MCM-5 ($P<0.0001$) expression, but was unrelated to the Ki67 index ($P>0.10$). Both MCM-2 and MCM-5 were associated significantly with adverse patients outcome in both univariate (≥ 20 vs $>20\%$, $P=.0011$ and $\geq 25\%$ vs $<25\%$, $P=0.0100$, respectively) and multivariate ($P=0.0001$ and $P=0.0090$, respectively) analysis. An adequately powered independent group of 45 patients was used in order to validate our results in univariate survival analysis regarding MCM-2 and MCM-5. In this group, MCM-2 and MCM-5 expression retained their prognostic significance ($P<0.0001$ in both relationships). In univariate survival analysis RPA2 overexpression ($\geq 60\%$ vs $<60\%$) was also correlated with adverse prognosis. In multivariate survival analysis, RPA2 expression emerged as an independent predictor of adverse outcome ($P<0.0001$) along with tumor histologic grade. RPA2 remained an independent predictor of survival ($P=0.002$) even after adjustment for MCM-2 and MCM-5 expression and when analysis was restricted to serous carcinomas ($P=0.004$). Our results further support the interrelation of RPA2 protein with MCM-2 and MCM-5 in OCs. Moreover, MCM-2, MCM-5 and RPA2 protein may play an important role in ovarian tumorigenesis, and may serve as useful independent molecular markers for stratifying patients with OC in terms of prognosis.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Απόδοση στην ελληνική γλώσσα της ορολογίας των όγκων της ωοθήκης σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ. ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ, 2012: p. 108-114.
2. Acs, G., *Serous and mucinous borderline (low malignant potential) tumors of the ovary*. Am J Clin Pathol., 2005. **123**: p. 13-57.
3. Anantha, R., Vassin, VM, Borowiec, JA., *Sequential and synergistic modification of human RPA stimulates chromosomal DNA repair*. J Biol Chem. , 2007. **42**: p. 35910-35923.
4. Anantha, R., Borowiec, JA., *Mitotic crisis: the unmasking of a novel role for RPA*. Cell Cycle., 2009. **8**: p. 357-361.
5. Anttila, M., Kosma, V-M, Hongxiu, J, Puolakka, J, Juhola, M, Saarikoski, S, Syrja'nen, K, *p21AA/AF1 expression as related to p53, cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian cancer*. Br J Cancer., 1999. **79**: p. 1870-1888.
6. Banks, L, Matlashewski, G, Crawford, L, *Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression*. . Eur J Biochem, 1986. **3**: p. 529-534.
7. Binz, S., Sheehan, AM, Wold, MS., *Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**: p. 1015-1024.
8. Blow, J., Laskey, RA *A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle*. Nature, 1988. **332**: p. 546-548.
9. Blow, J., Gillespie, PJ, *Replication licensing and cancer~a fatal entanglement?* . Nat Rev Cancer, 2008. **8**: p. 799-806.
10. Bochkarev, A., Pfuetzner, RA, Edwards, AM, Frappier, L, *Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA*. Nature, 1997. **385**: p. 176-181.

11. Bochkarev, A., Bochkareva, E, *From RPA to BRCA2: lessons from single-stranded DNA binding by the OB-fold*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**: p. 36-42.
12. Bochkareva E, K.S., Bochkarev A., *The role for zinc in replication protein A*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 27332-27338.
13. Bochman, M., Schwacha, A *The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity*. Mol Cell Biol., 2008. **31**: p. 287-293.
14. Bochman, M., Bell, SP, Schwacha, A *Subunit organization of Mcm2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability*. Mol Cell Biol., 2008. **28**: p. 5865-5873.
15. Boland, C, Goel, A *Somatic evolution of cancer cells*. Seminars in Cancer Biology, 2005. **15**: p. 436-450.
16. Branzei, D., Foiani, M, *Maintaining genome stability at the replication fork*. . Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**: p. 208-219.
17. Burks, R., Sherman, ME, Kurman, RJ., *Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors*. Am J Surg Pathol., 1996. **20**: p. 1319-1330.
18. Chibazakura, T., Kamachi, K, Ohara, M, Tane, S, Yoshikawa, H, et al. , *Cyclin A promotes S-phase entry via interaction with the replication licensing factor Mcm7*. Mol Cell Biol 2011. **31**: p. 248-255.
19. Chuang, L, Teixeira, LK, Wohlschlegel, JA, Henze, M, Yates, JR, et al. and 35:, *Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell-cycle re-entry*. Mol Cell Biol., 2009. **35**: p. 206-216.
20. Colombo, N., Peiretti, M, Parma, G, Lapresa, M, Mancar.i R, Carinelli, S, Sessa, C, Castiglione, M; ESMO, Guidelines, Working, Group., *Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol. , 2010. **5**: p. 23-30.

21. Cortez, D., Glick, G, Elledge, SJ *Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**: p. 10078-10083.
22. de Laat, W., Jaspers, NG, Hoeijmakers, JH, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes Dev. , 1999. **13**: p. 768-785.
23. Denkert, C, Dietel, M., *Borderline tumors of the ovary and peritoneal implants*. Verh Dtsch Ges Pathol., 2005. **89**: p. 84-91.
24. Endl, E., Gerdes, J (2000) and 371-380, *Posttranslational modifications of the KI-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis*. J Cell Physiol., 2000. **182**: p. 371-380.
25. Eward, K., Obermann, EC, Shreeram, S, Loddo, M, Fanshawe, T, Williams, C.Jung, H-Il, Prevost, AT, Blow, JJ, Stoeber, K, Williams, GH, *DNA replication licensing in somatic and germ cells*. . J Cell Sci 2004. **117**: p. 5875-5866.
26. Facoetti, A., Ranza, E, Benericetti, E, Ceroni, M, Tedeschi, F, Nano, R *Minichromosome maintenance protein 7: a reliable tool for glioblastoma proliferation index*. Anticancer Res, 2006. **26**: p. 1071-1075.
27. Fanning, E., Klimovich, Vitaly , and Andrew, R., Nager, *A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**: p. 4126-4137.
28. Ferguson RL, M.J., *Cyclin E-dependent localization of MCM5 regulates centrosome duplication*. J Cell Sci, 2008. **121**: p. 3224-3232.
29. Fernandez-Madrid, F., VandeVord, PJ, Yang, X, Karvonen, RL, Simpson, PM, Kraut, MJ, Granda, JL, Tomkiel, JE., *Antinuclear antibodies as potential markers of lung cancer*. Clin Cancer Res., 1999. **6**: p. 1393-1400.
30. FIGO, C.c.o.t., *Staging announcement*. Gynecol Oncology, 1989. **25**: p. 383-385.
31. Forsburg, S. and *Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**: p. 109-131.

32. Freeman, A., Morris, LS, Mills, AD, Stoeber, K, Laskey, RA, Williams, GH, Coleman, N (1999) *Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy*. Clin Cancer Res., 1999. **5**: p. 2121-2132.
33. Fried, L, Koumenis, C, Peterson, SR, Green, SL, van, Zijl, P, Allalunis-Turner, J, Chen, DJ, Fishel, R, Giaccia, AJ, Brown, JM, Kirchgessner, CU., *The DNA damage response in DNA-dependent protein kinase-deficient SCID mouse cells: replication protein A hyperphosphorylation and p53 induction*. Proc Natl Acad Sci USA., 1996. **93**: p. 13825-13830.
34. Gakiopoulou, H., Korkolopoulou, P, Levidou, G, Thymara, I, Saetta, A, Piperi, C, Givalos, N, Vassilopoulos, I, Ventouri, K, Tsenga, A, Bamias, A, Dimopoulos, MA, Agapitos, E, Patsouris, E., *Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications*. Br J Cancer., 2007. **97**: p. 1124-1134.
35. Ge, X., Jackson, DA, Blow, JJ *Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress*. Genes Dev., 2007. 21: p. 3331-3341.
36. Givalos, N., Gakiopoulou, H, Skliri, M, Bousboukea, K, Konstantinidou, AE, Korkolopoulou, P, Lelouda, M, Kouraklis, G, Patsouris, E, Karatzas, G., *Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer*. Mod Pathol. , 2007. **2**: p. 159-166.
37. Gomes, X., Henriksen, LA, Wold, MS., *Proteolytic mapping of human replication protein A: evidence for multiple structural domains and a conformational change upon interaction with single-stranded DNA*. Biochemistry. , 1996. **35**: p. 5586-5595.
38. Gonzalez, M., Pinder, SE, Callagy, G, Vowler, SL, Morris, LS, Bird, K, Bell, JA, Laskey, RA, Coleman, N *Minichromosome maintenance*

- protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. J Clin Oncol*, 2003. **21**: p. 4306-4313.
39. Greaves, M., Maley, CC, *CLONAL EVOLUTION IN CANCER*. *Nature*, 2012. **481**: p. 306-313.
 40. Hashimoto K, A.K., Osaki M, Nakamura H, Tomita K, Shimizu E, Ito, H, *MCM-2 and Ki-67 expression in human lung adenocarcinoma. Prognostic implications*. *Pathobiology*, 2004. **71**: p. 193-200.
 41. He, Z., Brinton, BT, Greenblatt, J, Hassell, JA, Ingles, CJ., *The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A*. *Cell.* , 1993. **73**: p. 1223-1232.
 42. He, Z., Henricksen, LA, Wold, MS, Ingles, CJ, *RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair*. *Nature*, 1995. **374**: p. 566-569.
 43. Heidebrecht, H., Buck, F, Endl, E, Kruse, ML, Adam-Klages, S, Andersen, K, Frahm, SO, Schulte, C, Wacker, HH, Parwaresch, R *Ki-Mcm6, a new monoclonal antibody specific to Mcm6: comparison of the distribution profile ofMcm6 and the Ki-67 antigen.* . *Lab Invest*, 2001. **81**: p. 1163-1165.
 44. Hubbi, M., Luo, W, Baek, JH, Semenza, GL, *MCM proteins are negative regulators of hypoxia-inducible factor 1.* . *Mol Cell Biol.*, 2011. **42**: p. 700-712.
 45. Hunt, D., Freeman, A, Morris, LS, Burnet, NG, Bird, K, Davies, TW, Laskey, RA, Coleman, N *Early recurrence of benign meningioma correlates with expression of mini-chromosome maintenance-2 protein*. *Br J Neurosurg* 2002. **58**: p. 51-56.
 46. Ibarra, A., Schwob, E, Mendez, J *Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication.* . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008. **105**: p. 8956-8961.
 47. Iftode, O, Daniely, Y, Borowiec, JA., *Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB*. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* , 1999. **34**: p. 141-180.

48. lives, I., Petojevic, T, Pesavento, JJ, Botchan, MR *Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins.* Mol Cell Biol., 2010. **37**: p. 247-258.
49. Jagannathan, M., Sakwe, AM, Nguyen, T, Frappier, L *The MCMassociated protein MCM-BP is important for human nuclear morphology.* . J Cell Sci 2012. **125**: p. 133-143.
50. Kanakis, D., Levidou, G, Gakiopoulou, H, Eftichiadis, C, Thymara, I, Fragkou, P, Trigka, EA, Boviatsis, E, Patsouris, E, Korkolopoulou, P., *Replication protein A: a reliable biologic marker of prognostic and therapeutic value in human astrocytic tumors.* Hum Pathol., 2011. **42**: p. 1545-1553.
51. Kato, H., Miyazaki, T, Fukai, Y, Nakajima, M, Sohda, M, Takita, J, Masuda, N, Fukuchi, M, Manda, R, Ojima, H, Tsukada, K, Asao, T, Kuwano, H *A new proliferation marker, minichromosome maintenance protein 2, is associated with tumour aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma.* J Surg Oncol, 2003. **84**: p. 24-30.
52. Kengo, S., Toyotaka, Ishibashi*, Yukinobu, Uchiyama and Kazuki, Iwabata, *The multi-replication protein A (RPA) system - a new perspective,* review, 2009.
53. Kim C, W.M., *Recombinant human replication protein A binds to polynucleotides with low cooperativity.* Biochemistry, 1995. **34**: p. 2058-2064.
54. Kingsbury, S., Loddo, M, Fanshwave, T, Obermann, EC, Prevost, AT, Stoeber, K, Williams, GH *Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells.* Exp Cell Res 2005. **309**: p. 56-67.
55. Kmet, L, Cook, LS, Magliocco, AM, *A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors.* . Cancer J, 2003. **97**: p. 389-404.
56. Kodani, I., Shomori, K, Osaki, M, Kuratate, I, Ryoke, K, Ito, H *Expression of minichromosome maintenance 2 (MCM2), Ki-67 and cell*

- cycle- related molecules, and apoptosis in the normal-dysplasia-carcinoma sequence of the oral mucosa. Pathobiology, 2001. 69: p. 150-158.*
57. Kodani, I., Osaki, M, Shomori, K, Araki, K, Goto, E, Ryoke, K, Ito, H *Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol, 2003. 32: p. 468-474.*
 58. Konstantinidou, A., Korkolopoulou, P, Vassilopoulos, I, Tsenga, A, Thymara, I, Agapitos, E, Patsouris, E, Davaris, P *Reduced retinoblastoma gene protein to Ki-67 ratio is an adverse prognostic indicator for ovarian adenocarcinoma patients. . Gynecol Oncol 2003. 88: p. 369-378.*
 59. Korkolopoulou, P., Vassilopoulos, I, Konstantinidou, AE, Zorzos, H, Patsouris, E, Agapitos, E, Davaris, P *The combined evaluation of p27kip and Ki-67 expression provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients. Gynaecol Oncol, 2002. 85 p. 404-414*
 60. Korkolopoulou, P., Givalos, N, Saetta, A, Goudopoulou, A, Gakiopoulou, H, Thymara, I, Thomas-Tsagli, E, Patsouris, E *Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: A multi-variate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators. HumPathol 2005. 36: p. 899-907.*
 61. Kruger, S., Thorns, C, Stocker, W, Muller-Kunert, E, Bohle, A, Feller, AC *Prognostic value of MCM2 immunoreactivity in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder.. Eur Urol, 2003. 43: p. 138-145.*
 62. Kubota, Y., Mimura, S, Nishimoto, S, Masuda, T, Nojima, H, Takisawa, H, *Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/PI proteins in Xenopus eggs. EMBO J, 1997. 16: p. 3320-3331.*

63. Kurman, R., ed. *Blaunstein's Pathology of the Female Genital Tract*. Fourth ed. Surface Epithelial-Stromal Tumors of the Ovary, ed. P. Russell. 1994: New York.
64. Kurman, R., Shih, leM., *Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications*. Int J Gynecol Pathol. , 2008. **27**: p. 151-160.
65. Labib, K., Diffley, JF, *Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase?* Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**: p. 64-70.
66. Lachin, J., *Introduction to sample size determination and power analysis for clinical trials*. . Control Clin Trials, 1981. **2**: p. 93-113.
67. Lachin, J., Foulkes, MA *Evaluation of sample size and power analysis of survival with allowance for nonuniform patient entry, losses to follow-up noncompliance and stratification*. Biometrics, 1986. **42**: p. 507-519.
68. Lei, M., Tye, BK *nitating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex*. . IJ Cell Sci, 2001. **114**: p. 1447-1454.
69. Levidou, G., Korkolopoulou, P, Thymara, I, Vassilopoulos, I, Saetta, AA, Gakiopoulou, H, Konstantinidou, A, Kairi-Vassilatou, E, Pavlakis, K, Patsouris, E., *Expression and prognostic significance of cyclin D3 in ovarian adenocarcinomas*. Int J Gynecol Pathol. , 2007. **4**: p. 410-417.
70. Levidou, G., Gakiopoulou, H, Kavantzias, N, Saetta, AA, Karlou, M, Pavlopoulos, P, Thymara, I, Diamantopoulou, K, Patsouris, E, Korkolopoulou, P., *Prognostic significance of replication protein A (RPA) expression levels in bladder urothelial carcinoma*. BJU Int. , 2011. **108**: p. 59-65.
71. Levidou, G., Ventouri, K, Nonni, A, Gakiopoulou, H, Bamias, A, Sotiropoulou, M, Papaspirou, I, Dimopoulos, MA, Patsouris, E, Korkolopoulou, P., *Replication protein A in nonearly ovarian adenocarcinomas: correlation with MCM-2, MCM-5, Ki-67 index and prognostic significance*. Int J Gynecol Pathol., 2012. **31**: p. 319-327.

72. Li, L., Lu, X, Peterson, CA, Legerski, RJ, *An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair.* Mol Cell Biol., 1995. **15**: p. 5396-5404.
73. Maiorano, D., Lutzmann, M, Mechali, M *MCM proteins and DNA replication.* Curr Opin Cell Biol 2006. **18**: p. 130-136.
74. Maria, J., Rodrigues, da, Silva, *ROLE OF CTF18-RFC COMPLEX IN HUMAN DNA REPLICATION PROGRAMS*, U.d. lisboa, Editor. 2011.
75. Meng, M., Grossfeld, GD, Williams, GH, Dilworth, S, Stoeber, K, Mulley, TW, Weinberg, V, Carroll, PR, Tlsty, TD, *Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer.* Clin Cancer Res., 2001. **7**: p. 2712-2718.
76. Moyer, S., Lewis, PW, Botchan, MR *Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase.* Proc Natl Acad Sci USA., 2006. **103**: p. 10236-10241.
77. Mukherjee, G., Freeman, A, Moore, R, Kumaraswamy, P, Devi, KU, Morris, LS, Coleman, N, Dilworth, S, Prabhakaran, PS, Stanley, MA *Biologic factors and response to radiotherapy in carcinoma of the cervix.* Int J Gynecol Cancer, 2001. **11**: p. 187-193.
78. Musahl, O, Holthoff, HP, Lesch, R, Knippers, R *Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells.* Exp Cell Res, 1998. **241**: p. 260-264.
79. Nakaya R, T.J., Onuki T, Moritani M, Nozaki N, Ishimi Y, *Identification of proteins that may directly interact with human RPA.* J Biochem, 2010. **148**: p. 539-547.
80. Neben, K., Korshunov, A, Benner, A, Wrobel, G, Hahn, M, Kokocinski, F, Golanov, A, Joos S, Lichter P *Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival.* . Cancer Res., 2004. **64**: p. 3103-3111.
81. Obstetrics, C.C.o.t.l.F.o.G.a., *Staging Announcement.* . Gynaecol Oncol, 1986. **25**: p. 383-385.

82. Ortiz, B., Ailawadi, M, Colitti, C, Muto, MG, Deavers, M, Silva, EG, Berkowitz, RS, Mok, SC, Gershenson, DM., *Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors.* Cancer Research, 2001. 61 (19): p. 7264-7267.
83. Osaki, M., Osaki, M, Yamashita, H, Shomori, K, Yoshida, H, Ito, H *Expression of minichromosome maintenance-2 in human malignant fibrous histiocyctomas: correlations with Ki-67 and p53 expression, and apoptosis.* . Int J Mol Med 2002. 10: p. 161-168.
84. Ozols, R., *Update on the managment of ovarian cancer.* Cancer J, 2002. 8: p. 22-30.
85. Palazzo, J., Monzon, F, Burke, M, Hyslop, T, Dunton, C, Barusevicius, A, Capuzzi, D, Kovatich, AJ, *Overexpression of p21WAF1/CIP1 and MDM2 characterizes serous borderline ovarian tumors.* Hum Pathol 2000. 31: p. 698-704.
86. Peters KB, W.H., Brown JM, Iliakis G., *Inhibition of DNA replication by tirapazamine.* Cancer Res. , 2001. 61: p. 5425-5431.
87. Philipova, R., Vassilev, AP, Kaneva, RP, Andreeva, P, Todorov, T, Hadjiolov, AA, *Expression of the nuclear protein mitosin in differentiating in vitro HL60 cells.* Biol Cell, 1991. 72: p. 47-50.
88. Ramnath, N., Hernandez, FJ, Tan, DF, Huberman, JA, Natarajan, N, Beck, AF, Hyland, A, Todorov, IT, Brooks, JS, Bepler, G *MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer.* J Clin Oncol 2001. 19: p. 4259-4266.
89. Reles, A., Wen, WH, Schmider, A, Gee, C, Runnebaum, IB, Kilian, U, Jones, LA, El-Naggar, A, Minguillon, C, Schonborn, I, Reich, O, Kreienberg, R, Lichtenegger, W, Press, MF *Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer.* Clin Cancer Res 2001. 7: p. 2984-2997.

90. Richter, A., Knippers, R *High-molecular-mass complexes of human minichromosome-maintenance proteins in mitotic cells.* Eur J Biochem, 1997. 247: p. 136-141.
91. Ritzi, M., Baack, M, Musahl, C, Romanowski, P, Laskey, RA, Knippers, R *Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex protein on chromatin.* J Biol Chem, 1998. 273: p. 24543-24549.
92. Ritzi, M., Knippers, R *Initiation of genome replication: assembly and disassembly of replication-competent chromatin.* Genes Dev., 2000. **245**: p. 13-20.
93. Rodins, K., Cheale, K, Coleman, N, Fox, SB *Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility.* Clinical Cancer Res, 2002. 8: p. 1075-1081.
94. Rosenwald, A., Wright, G, Wiestner, A, Chan, WC, Connors, JM, Campo, E, Gascoyne, RD, Grogan, TM, Muller-Hermelink, HK, Smeland, EB, Chiorazzi, M, Giltner, JM, Hurt, EM, Zhao, H, Averett, L, Henrickson, S, Yang, L, Powell, J, Wilson, WH, Jaffe, ES, Simon, R, Klausner, RD, Montserrat, E, Bosch, F, Greiner, TC, Weisenburger, DD, Sanger, WG, Dave, BJ, Lynch, JC, Vose, J, Armitage, JO, Fisher, RI, Miller, TP, LeBlanc, M, Ott, G, Kvaloy, S, Holte, H, Delabie, J, Staudt, LM *The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma.* Cancer Cell 2003. **3**: p. 185-197.
95. Russel, P., *Surface epithelial-stromal tumors of the ovary.* In *Blaustein's pathology of the female genital tract* Kurman RJ (ed), 4th edn., 1994: p. 705-782.
96. Schmider-Ross, A., Pirsig, O, Gottschalk, E, Denkert, C, Lichtenegger, W, Reles, A *Cyclin-dependant kinase inhibitors CIP1 (p21) and KIP1 (p27) in ovarian cancer.* J Cancer Res Clin Oncol, 2006. **132**: p. 163-170.

97. Schrader, C, Janssen, D, Klapper, W, Siebmann, JU, Meusers, P, Brittinger, G, Kneba, M, Tiemann, M, Parwaresch, R *Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma.* Br J Cancer 2005. **93**: p. 939-945.
98. Sclafani RA, H., TM, *Cell cycle regulation of DNA replication.* Annu Rev Genet 2007. **41**: p. 237-280.
99. Scott, I., Heath, TM, Morris, LS, Rushbrook, SM, Bird, K, Vowler, SL, Arends, MJ, Coleman, N, *A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens.* Br J Cancer 2004. **19(90)**: p. 1583-1590.
100. Scully, R., Sobin, LH *Histologic typing of ovarian tumours.* Arch Pathol Lab Invest, 1987. **111**: p. 794-795.
101. Sengupta, P., McGown, AT, Bajaj, V, Blackhall, F, Swindell, R, Bromley, M, *p53 and related proteins in epithelial ovarian cancer.* Eur J Cancer, 2000. **36**: p. 2317-2328.
102. Shetty, A., Loddo, M, Fanshawe, T, Prevost, AT, Sainsbury, R, Williams, GH, Stoeber, K *DNA replication licensing and cell cycle kinetics of normal and neoplastic breast.* Br J Cancer 2005. **93**: p. 1295-1300.
103. Singh, K., Samson, L., *Replication protein A binds to regulatory elements in yeast DNA repair and DNA metabolism genes.* Proc Natl Acad Sci USA., 1995. **92**: p. 4907-4911.
104. Sotiriou, O, Neo, SY, McShane, LM, Korn, EL, Long, PM, Jazaeri, A, Martiat, P, Fox,SB, Harris, AL, Liu, ET *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.* Proc Natl Acad Sci USA 2003. **100**: p. 10393-10398.
105. Sternberg, S., ed. *Histology for Pathologists.* Second ed. Histology of the Ovary, ed. P. Clement. 1997, Lippincot-Raven: New York. 929-959.

106. Stoeber, K., Tlsty, TD, Happerfield, L, Thomas, GA, Romanov, S, Bohrow, L, Williams, ED, Williams, GH *DNA replication licensing and human cell proliferation*. J Cell Sci 2001. **114**: p. 2027-2041.
107. Suhasini, A., N, Brosh, Robert, M. Jr.*, *Mechanistic and biological aspects of helicase action on damaged DNA*. Cell Cycle., 2010. **9**: p. 2317-2329.
108. Tachibana, K., Gonzalez, MA, Coleman, N *Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology*. J Patgology, 2005. **205**: p. 123-129.
109. Tanaka T, N.K., *Association of RPA with chromosomal replication origins requires an Mcm protein, and is regulated by Rad53, and cyclin- and Dbf4-dependent kinases*. EMBO J, 1998. **17**: p. 5182-5191.
110. Tavasoli, F., Devilee.P, *WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics*. Lyon:IARK Press, 2003: p. 113-146.
111. Tenca, P., Brotherton, D, Montagnoli,A, Rainoldi, S, Albanese, C, et al., *Cdc7 is an active kinase in human cancer cells undergoing replication stress*. J Biol Chem 2007. **282**: p. 208-215.
112. Tho'mmes, P., Kubota, Y, Takisawa, H, Blow, JJ, *The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/PI polypeptides*. EMBO J 1997. **16**: p. 3312-3319.
113. Tin, N., Madhav, Jagannathan, Kathy, Shire, Lori, Frappier, *Interactions of the Human MCM-BP Protein with MCM Complex Components and Dbf4*. PLoS One. , 2012. **7**: p. 35931-.v/
114. Todorov, I., Pepperkok, R, Philipova, RN, Kearsey, SE, Ansorge, W, Werner, D, *A human nuclear protein with sequence homology to a family of early S phase proteins is required for entry into S phase and for cell division*. J Cell Sci 1994.**107**: p. 253-265.
115. Todorov, I., Werness, BA, Wang, HQ, Buddharaju, LN, Todorova, PD, Slocum, HK, Brooks, JS, Huberman, JA *HsMCM2/BM28: a novel*

- proliferation marker for human tumors and normal tissues*. Lab Invest, 1998. **78**: p. 73-78.
116. Tomkiel, J., Alansari, H, Tang, N, Virgin, JB, Yang, X, VandeVord, P, Karvonen, RL, Granda, JL, Kraut *Autoimmunity to the M(r) 32,000 subunit of replication protein A in breast cancer*. Clin Cancer Res., 2002. **8**: p. 752-758.
 117. Tye, B., *MCM proteins in DNA replication*. . Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 649-686.
 118. Van't Veer, L., Dai, H, van de Vijver, MJ, He, YD, Hart, AA, Mao, M, Peterse, HL, van der Kooy, K, Marton, MJ, Witteveen, AT, Schreiber, GJ, Kerkhoven, RM, Roberts, C, Linsley, PS, Bernards, R, Friend, SH, *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**: p. 530-536.
 119. Vang, R., Shih, leM, Kurman, RJ., *Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems*. Adv Anat Pathol, 2009. **16**: p. 267-282.
 120. Vassilopoulos, I., Korkolopoulou, P, Konstantinidou, AE, Patsouris, E, Eftichiadis, C, Thymara, I, Perdiki, M, Pavlakis, K, Agapitos, E, Davaris, PS *Evaluation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 in epithelial ovarian tumors of low malignant potential and adenocarcinomas*. Histol Histopathol 2003. **18**: p. 761-770.
 121. Vassin, V., Anantha, RW, Sokolova, E, Kanner, S, Borowiec, JA., *Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stres*. J Cell Sci., 2009. **122**: p. 4070-4080.
 122. Wang, Q., Shen, F, Luo, X, Moore, DC, Flanagan, M, Studzinski, GP, *Lowering of p27Kip1 levels by its antisense or by development of resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses the G1 block but not differentiation of HL60 cells*. Leukemia 1998. **12**: p. 1256-1265.

123. WB., O, *Developments in the pathology of ovarian tumours*. Curr Opin Obstet Gynecol. , 2001. **13**: p. 53-59.
124. Wharton, S., Chan, KK, Anderson, JR, Stoeber, K, Williams, GH *Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2001. **27**: p. 305-313.
125. Yu, K., Lee, CH, Tan, PH, Hong, GS, Wee, SB, Wong, CY, Tan, P *A molecular signature of the Nottingham prognostic index in breast cancer*. Cancer Res., 2004. **64**: p. 2962-2968.
126. Yu, Z., Feng, D, Liang, C *Pairwise interactions of the six human MCM protein subunits*. J Mol Biol 2004. **340**: p. 1197-1206.
127. Zhou, P., Yao, Y, Shoh, JW, Weinstein, IB *Overexpression of p21Cip1 or p27Kip1 in the promyelocyte leukemia cell line HL60 accelerates its lineage-specific differentiation*. Anticancer Res 1999.**19**: p. 4935-4945.
128. Zou, Y., Liu, Y, Wu, X, Shell, SM., *Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses*. J Cell Physiol., 2006. **208**: p. 267-273.
129. Βασιλάτου, Ε.Κ., *Βλεννώδη Νεοπλάσματα Ωοθηκών. Θέματα Γυναικολογικής Παθολογικής Ανατομικής. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα ειδικευομένων ιατρών παθολογοανατομικού εργαστηρίου. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Αρεταίειο Νοσοκομείο. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.*, 2012. 8: σελ. 63-94.
130. Βασιλάτου, Ε.Κ., *Η συμβολή της ανοσοϊστοχημείας στη διαφορική διάγνωση των ωοθηκικών όγκων, θέματα Γυναικολογικής Παθολογικής Ανατομικής. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα ειδικευομένων ιατρών Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Αρεταίειο Νοσοκομείο. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.*, 2012. 8: σελ. 169-196.
131. Ιαβάτσο Χ., Μ.Ι., Σαλάκος Ν., *Προέλευση και παθογένεση των επιθηλιακών όγκων των ωοθηκών. Η άποψη του γυναικολόγου, θέματα*

- Γυναικολογικής Παθολογικής Ανατομικής. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα ειδικευομένων ιατρών του παθολογοανατομικού εργαστηρίου. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Αρεταίειο Νοσοκομείο. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών., 2012. 8: σελ. 33-61
132. Σπανίδου - Καρβούνη, Ε., *Όγκοι του επιφανειακού επιθηλίου-στρώματος των ωοθηκών (Κοινοί επιθηλιακοί όγκοι), Μετεκπαιδευτικά μαθήματα ειδικευομένων ιατρών Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου., Ε.Π.Α. Αρεταίειο Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Αθήνα 2004, σελ. 209-227.*
 133. Σπανίδου - Καρβούνη, Ε., *Σταδιοποίηση του καρκίνου, Θέματα Παθολογικής Ανατομικής για Ειδικευόμενους, Ε.Π.Α. Αρεταίειο Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Αθήνα 2008, σελ. 7-22.*
 134. Cooper GM (2000). "Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle". The cell: a molecular approach (2nd ed.). Washington, D.C: ASM Press.
 135. Rubenstein, Irwin, and Susan M. Wick. "Cell." World Book Online Reference Center. 2008. 12 January 2008
 136. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (December 1998). "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization". *Mol. Biol. Cell* 9 (12): 3273–97.
 137. Nigg EA (June 1995). "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle". *BioEssays* 17 (6): 471–80.
 138. Norbury C (1995). "Cdc2 protein kinase (vertebrates)". In Hardie, D. Grahame; Hanks, Steven. *Protein kinase factsBook*. Boston: Academic Press. pp. 184.
 139. Pramila T, Wu W, Miles S, Breeden L (August 2006). "The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle". *Genes Dev* 20 (16): 2266–227.

140. Ubersax J, et. al (October 2003). "Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1". *Nature* 425 (6960): 859–864. Bibcode 2003Natur.425..859U.
141. 88. (D.Bell, MA.Weinstock, R.E.Scully. Peritoneal implants of ovarian serous borderline tumors. Histologic features and prognosis. *Cancer* 62:2212-2222,. 1988
142. Is Micropapillary serous carcinoma for real? *Cancer* 95:677-680, 2002 και D.Bell et al *Cancer* 1988).
143. Treatment of micropapillary serous ovarian carcinoma (the aggressive variant of serous borderline tumors) *Cancer* 95:675-6, 2002. Subclassification of serous borderline tumors of the ovary into benign and malignant types. A clinicopathologic study of 65 advanced stage cases. *Am J Surg Pathol* 20: 1331-1345, 1996).
144. Is micropapillary serous carcinoma for real? *Cancer* 95:677-680, 2002).
145. C.B.Gilks.DABell et al. Serous psammocarcinoma of the ovary and peritoneum. *Int J Gynecol Pathol* 9:110-121, 1990
146. S. Silverberg. Histopathologic grading of ovarian carcinoma. A review and proposal. *Int.J Gynecol Pathol* 19:7-15, 2000. Y.Sato et al Prognostic value of histologic grading of ovarian serous carcinomas *Int J Gyn Pathol* 22:52-56, 2002).
147. J.Dauplat, et al. Distant metastases in epithelial ovarian cancer. *Cancer* 60:1561-1566, 1987)
148. Hart & Norris (*Cancer* 31:1031-1045, 1973) και Hart (*Hum Pathol* 8:541-549, 1977)
149. R.Lee & R.E.Scully.Mucinous tumors of the ovary: A clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with "pseudomyxoma peritonei" *Am J Surg Pathol* 24:1447-1464, 2000).
150. (I.M.Rodriguez & J.Pratt. Mucinous tumors of the ovary. A clinicopathologic analysis of 75 borderline tumors of intestinal type and carcinomas. *Am J Surg Pathol* 26:139-152, 2002).

151. Rutgers & Scully Cancer 61:340-348, 1988 (S. Siriaunkgul et al Int J Gynecol Pathol 14:198-208, 1995)
152. 99KABell & R.J.Kurman. A clinicopathologic analysis of atypical proliferative (borderline) tumors and well differentiated endometrioid adenocarcinomas of the ovary. Am J Surg Pathol 24:1465-1479, 2000) .
153. B.Clement, R.H.Young. Atlas of Gynecologic Surgical Pathology pp316-317. W.B.Saunders 2000
154. M.M. Shevchuk, B.Winkler et al. Clear cell Carcinoma of the ovary. A clinicopathologic study and review of the literature. Cancer 47:1344-1351, 1981).
155. M.R. Pins, R.H.Young, W.J.Daly, R.E.Scylly. Primary squamous cell carcinoma of the ovary. Report of 37 cases. Am J Surg Pathol 20:823-833, 1996).
156. Hashimoto K, Araki K, Osaki M, Nakamura H, Tomita K, Shimizu E, Ito H (2004) MCM-2 and Ki-67 expression in human lung adenocarcinoma: prognostic implications. Pathobiology 71: 193-200
157. Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors. Am J Surg Pathol 20:1319-1330,1996
158. Organization of the archaeal MCM complex on DNA and implications for the helicase mechanism. McGeoch AT, Trakselis MA, Laskey RA, Bell SD. Nat Struct Mol Biol. 2005 Sep;12(9):756-62. Epub 2005 Aug 14.
159. Sato N, Arai K, Masai H (Sep 1997). "Human and Xenopus cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7". EMBO J 16 (14): 4340–51.
160. Targeting Cell Division Cycle 7 Kinase: (July 20, 2010) A New Approach for Cancer Therapy. Alessia Montagnoli, Jürgen Moll, and Francesco Colotta Molecular Pathways, American Association for Cancer Research.