



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Αποτίμηση της βιολογικής δράσης μιας νέας χημικής ένωσης ως χημικοθεραπευτικό
φάρμακο για τον καρκίνο των ωοθηκών**

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΚΑΚΟΥΛΛΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

24 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αποτίμηση της βιολογικής δράσης μιας νέας χημικής ένωσης ως χημικοθεραπευτικό φάρμακο
για τον καρκίνο των ωοθηκών

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΚΑΚΟΥΛΛΗ

A.M.: 71703

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αριστείδης Ηλιόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αριστείδης Ηλιόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Εύη Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Μαρία Ρουμπελάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

24 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι από τους λίγους καρκίνους οι οποίοι διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο. Θεωρείται μια από τις πιο κοινές γυναικολογικές αιτίες θανάτου. Η θεραπεία του καρκίνου αυτού απαιτεί περαιτέρω έρευνα και θεωρείται πόλος ενδιαφέροντος στην επιστημονική κοινότητα. Συγκεκριμένα, ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών μπορεί να υποδιαιρεθεί σε άλλους υπότυπους κι αυτό περιπλέκει περισσότερο τη νόσο αυτή.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται μια αναφορά όσον αφορά τους βιβλιογραφικούς παράγοντες για την εμφάνιση του καρκίνου των ωοθηκών, τα συμπτώματα που έχουν κατηγοριοποιηθεί, τους τρόπους διάγνωσης και θεραπείας που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο.

Κύριος σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της βιολογικής δράσης μιας νέας χημικής ένωσης, ονόματι «compound 127», ώστε να χαρακτηριστεί ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο για τον πολύπλοκο αυτό καρκίνο. Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε γύρω από την κυτταροτοξικότητα της ένωσης αυτής και το μηχανισμό δράσης της στο DNA. Όλα τα πειράματα έγιναν στο εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ, με δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές: την A2780 ευαίσθητη σειρά και την A2780CP, μια ανθεκτική σειρά. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές όπως είναι: η κυτταροκαλλιέργεια, το MTT assay, ο κυτταρικός κύκλος, το colony formation, το Western blot και ο ανοσοφθορισμός. Όλες οι μελέτες έγιναν πάντα, σε σύγκριση με το κύριο χημειοθεραπευτικό φάρμακο το cisplatin.

Συμπερασματικά, η νέα ένωση φαίνεται να έχει χημειοθεραπευτική δράση σε μικρότερη συγκέντρωση από το cisplatin επειδή επάγει πιο γρήγορα τον κυτταρικό θάνατο, μπορεί χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να δράσει από το cisplatin σκοτώνοντας περισσότερα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, συγκεντρώνεται σε διαφορετική φάση στον κυτταρικό κύκλο από το cisplatin κι αυτό σημαίνει ότι δρα με διαφορετικό μηχανισμό από αυτό.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: καρκίνος των ωοθηκών

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ωοθήκες, χημειοθεραπευτικό, κυτταροτοξικότητα, ευαισθησία, ανθεκτικότητα

ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the few cancers which is diagnosed at an advanced stage. It is one of the most common gynaecological death's cause. The treatment of this cancer requires further research and is one of the greatest interest of the scientific community. Specifically, epithelial ovarian cancer is divided into other subtypes which complicate this disease further.

In this thesis, a literature review is made on ovarian cancer, the categorized symptoms, the main diagnostic and treatment modalities.

The main purpose of this thesis is to study the biological effect of a new compound, «compound 127», to qualify as a chemotherapeutic drug for this cancer. This study focused on the cytotoxicity of this compound and the mechanism which affect the DNA. All experiments were performed in the Biology Laboratory in Medical School of the National and Kapodistrian University of Athens with two ovarian cancer cell lines: the A2780 with sensitivity to cisplatin and the A2780CP with resistivity to cisplatin. Various techniques were used such as cell culture, MTT assay, cell cycle, colony formation, Western blot and immunofluorescence. All studies were always compared to the main chemotherapeutic drug, the cisplatin.

In conclusion, the «compound 127» appears to have chemotherapeutic activity at a lower concentration than cisplatin because it induces cell death more rapidly, it may take longer to act than cisplatin by killing more cancer cells. It also concentrates at a different phase in the cell cycle than cisplatin and this means that it acts by a different mechanism than it.

SUBJECT AREA: ovarian cancer

KEYWORDS: ovary, chemotherapy, cytotoxicity, sensitivity, durability

Αφιερωμένο στην αγαπημένη μου,

γιαγιά,

Θεανώ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Κλινική Χημεία» του τμήματος Χημείας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, με την παρούσα παράγραφο αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην πορεία μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, αλλά και στην πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, καταρχάς, στον Καθηγητή και επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας κύριο Αριστείδη Ηλιόπουλο για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις επί της οργάνωσης, της δομής και του περιεχομένου της παρούσας εργασίας. Κυρίως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω, διότι μέσα από τις γνώσεις, τις σκέψεις και τις εργαστηριακές του δεξιότητες, εμπλούτισε τις γνώσεις μου και με βοήθησε στην ένταξη μου στον εργαστηριακό χώρο.

Ιδιαιτέρως, ευχαριστώ τη φίλη και υποψήφια διδάκτωρ Νάντια, που με την έμπρακτη υποστήριξη της, τις γνώσεις και τις επίμονες παροτρύνσεις της, με ενθάρρυνε καθημερινά, συμβάλλοντας με το δικό της ξεχωριστό τρόπο στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κυρία Εύη Λιανίδου, υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος "Κλινικής Χημείας" για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο πρόγραμμα αυτό

Επιπλέον, θέλω να εκφράσω την εκτίμηση μου προς τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους μου για την ανοχή και αντοχή που επέδειξαν στο διάστημα αυτό. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Σταυρούλα, που κάναμε αυτό το "ταξίδι" μαζί, πιο χαρούμενο και ξέγνοιαστο, καθώς επίσης, την Κατερίνα, την Αϊλντα και την Κωνσταντίνα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου, τους γονείς μου Αντώνη και Άννα, καθώς τα αδέρφια μου Αντρέα και Μίνω και το σύντροφο μου Αντρέα για την ηθική τους στήριξη. Ευχαριστώ, που σε κάθε βήμα και απόφαση μου βρίσκεστε πάντα δίπλα μου, δίνοντας μου δύναμη και ελπίδα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	3
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΟΘΗΚΩΝ	3
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία για τον καρκίνο των ωοθηκών:	4
1.3 Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών:	6
1.3.1 Ηλικία:	6
1.3.2 Οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο των ωοθηκών ή μαστού:	7
1.3.3 Σύνδρομο Lynch - κληρονομούμενος μη πολυποδιασικός καρκίνος παχέος εντέρου (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC): ..	9
1.3.4 Θεραπεία αντικατάστασης ορμονών (HRT: Hormone Replacement Therapy)	9
1.3.5 Παχυσαρκία:	10
1.3.6 Στοματικά αντισυλληπτικά:	11
1.3.7 Μητρότητα - θηλασμός:	12
1.3.8 Ωοθηκεκτομή:	12
1.3.9 Ασπιρίνη:	12
1.3.10 Μεσογειακή διατροφή:	13
1.3.11 Άσκηση και φυσική κατάσταση:	14
1.4 Διάγνωση:	15
1.4.1 CA-125:	16
1.4.2 Χειρουργική επέμβαση	18
1.5 Υπότυποι του καρκίνου των ωοθηκών:	20
1.5.1 HGSC: ΥΨΗΛΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	21
1.5.2 LGSC: ΧΑΜΗΛΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	22

1.5.3 STIC: ΣΩΛΗΝΟΕΙΔΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟ ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	23
1.5.4 CLEAR-CELL CARCINOMA (CCC): ΔΙΑΥΓΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	23
1.5.5 ENDOMETRIOID ADENOCARCINOMA: ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	24
1.5.6 MUCINUS ADENOCARCINOMA: ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	24
1.6 Υποτροπιάζον καρκίνος των ωοθηκών (ROC: recurrent ovarian cancer).....	26
1.6.1 Ευαίσθητη στην πλατίνη ασθένεια.....	27
1.6.2 Ασθένεια ανθεκτική στην πλατίνη.....	28
1.7 Θεραπείες - Διαθέσιμες για καρκίνο των ωοθηκών.....	29
1.7.1 Μηχανισμοί:.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	32
ΣΚΟΠΟΣ:.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	33
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
3.1 Υλικά και μέθοδοι.....	33
3.1.1 Αντισώματα και αντιδραστήρια:.....	33
3.1.2 Κυτταροκαλλιέργεια:.....	34
3.1.3 Τεχνική MTT (MTT assay).....	35
3.1.4 Κυτταρικός Κύκλος (Cell Cycle):.....	37
3.1.5 Clonogenic assay or colony formation assay	38
3.1.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blot):	40
3.1.7 Ανοσοφθορισμός:.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	44

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	53
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
5.1 Κυτταροτοξικότητα	54
5.2 Επαγωγή βλάβης στο DNA:.....	55
5.3 Μελλοντικές προοπτικές της θεραπείας:	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	57
ΕΠΙΛΟΓΟΣ:.....	57
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	58
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	61
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΤΤ. ΈΠΕΙΤΑ ΑΠΟ 72 ΩΡΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ, ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΟΥ MTS ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΓΙΑ 3 ΩΡΕΣ ΣΤΟΥΣ 37°C. ΤΕΛΟΣ, ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΣΤΑ 490NM.	36
ΣΧΗΜΑ 2: Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ (CELL CYCLE) ΕΙΝΑΙ ΜΙΑ ΠΟΛΥ ΚΑΛΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΚΥΡΙΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ, ΟΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ ΤΗ ΜΕΣΟΦΑΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ. ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ, ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ:	37
ΣΧΗΜΑ 3: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΡΙ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ.	38
ΣΧΗΜΑ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ COLONY FORMATION. Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΥΤΗ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΔΙΑΡΚΕΣΕΙ 10 – 14 ΜΕΡΕΣ, ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ. ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΥΤΗ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ A2780 ΚΑΙ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΓΙΑ 8 ΩΡΕΣ. 700 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΑ ΠΗΓΑΔΙ (ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΗ ΠΛΑΚΑ 6 ΠΗΓΑΔΙΩΝ) ΟΠΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ 10 ΜΕΡΕΣ ΜΕΧΡΙ ΝΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΟΥΝ ΟΙ ΑΠΟΙΚΙΕΣ. ΤΕΛΟΣ, ΓΙΝΕΤΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ 37% ΦΟΡΜΑΛΔΕΪΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΤΟ CRYSTAL VIOLET. 39	
ΣΧΗΜΑ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN ΣΕ ΤΡΙΑ ΣΤΑΔΙΑ :	40
ΣΧΗΜΑ 6: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΗ ΠΛΑΚΑ 24 ΠΗΓΑΔΙΩΝ, ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΕΣ ΚΑΛΥΠΤΡΙΔΕΣ, ΟΙ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΣΗΜΕΙΩΝΟΝΤΑΙ, 4% PFA (ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗ), 0,1% TRITON X-100 ΣΕ PBS, ΠΡΩΤΟΤΑΓΗ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΙΔΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟ, PROLONG GOLD ANTIFADE MOUNTANT ΜΕ DAPI, ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΥΣ ΠΛΑΚΕΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....	43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ. ΑΡΙΣΤΕΡΑ ΥΓΙΗΣ ΩΟΘΗΚΗ ΚΑΙ ΔΕΞΙΑ ΑΠΟΘΗΚΗ ΠΟΥ ΕΧΕΙ ΠΡΟΣΒΛΗΘΕΙ ΑΠΟ ΚΑΡΚΙΝΟ	3
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΤΑΣΗ ΤΗΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΣΕ ΜΕΡΙΚΕΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΕΣ ΧΩΡΕΣ 1980-2009 ¹³	5
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΚΟΙΝΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΚΙΝΔΥΝΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ¹	8
ΕΙΚΟΝΑ 4: Η ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΙ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ⁴⁵	13
ΕΙΚΟΝΑ 5: Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΑΛΛΑΖΕΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΕΤΑΙ ΚΑΙ ΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ, ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΣΚΙΤΗ. Ο ΑΣΚΙΤΗΣ ΕΙΝΑΙ Η ΠΕΡΙΣΣΕΙΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΥΓΡΟΥ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ. ΟΙ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ Η ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΛΕΜΦΙΚΗ ΡΟΗ, ΣΥΜΒΑΛΛΟΥΝ ΟΛΕΣ ΣΤΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΙ ΕΤΣΙ ΜΕΙΩΝΟΥΝ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ, ΕΤΣΙ ΩΣΤΕ Η ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΤΗΣ ΡΟΗΣ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ ⁵⁹	17
ΕΙΚΟΝΑ 6: ΟΙ ΑΛΛΑΓΕΣ ΠΟΥ ΕΓΙΝΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΕΘΝΗ ΟΜΟΣΠΟΝΔΙΑ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ (FIGO) ΣΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ⁶⁴	19
ΕΙΚΟΝΑ 7: ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΑΦΕΙΣ ΜΕΤΑΜΑΛΛΑΞΕΙΣ / ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΤΕΛΕΙΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΔΕΙΑ ΤΗΣ AACR ⁶⁷	20
ΕΙΚΟΝΑ 8: ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ¹	21
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ, ΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΧΩΡΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΠΕΝΤΕ ΒΑΣΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ:	25
ΕΙΚΟΝΑ 10: Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΤΑ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ 50 ΧΡΟΝΙΑ ¹¹⁴	29
ΕΙΚΟΝΑ 11: ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ A2780 (ΑΡΙΣΤΕΡΑ) ΚΑΙ A2780CP (ΔΕΞΙΑ) ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	34
ΕΙΚΟΝΑ 12: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΟΥΣΙΩΝ.	46
ΕΙΚΟΝΑ 13: ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ COLONY FORMATION, ΟΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A2780 ΜΕ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ CISPLATIN ΚΑΙ ΤΗΝ «COMPOUND 127».	48
ΕΙΚΟΝΑ 14: ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ: CISPLATIN, COMPOUND 127	51
ΕΙΚΟΝΑ 15: ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΟΥΣΙΩΝ ΒΑΣΕΙ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ P-53 ΚΑΙ Γ-H2AX, ΜΕ ΕΛΕΓΧΟ ΦΟΡΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ Β-ΑΚΤΙΝΗ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΓΙΑ 2 ΜΕΧΡΙ 12 ΩΡΕΣ.	52

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ
ΩΟΘΗΚΩΝ 11

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΩΝ ΟΡΩΝ 58

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της ολοκλήρωσης των σπουδών μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα "Κλινικής Χημείας" στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Πρόκειται για τη βιολογική μελέτη μιας νέας χημικής ένωσης ως χημιοθεραπευτικό φάρμακο για τον καρκίνο των ωοθηκών.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του κ. Αριστείδη Ηλιόπουλου, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογίας στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

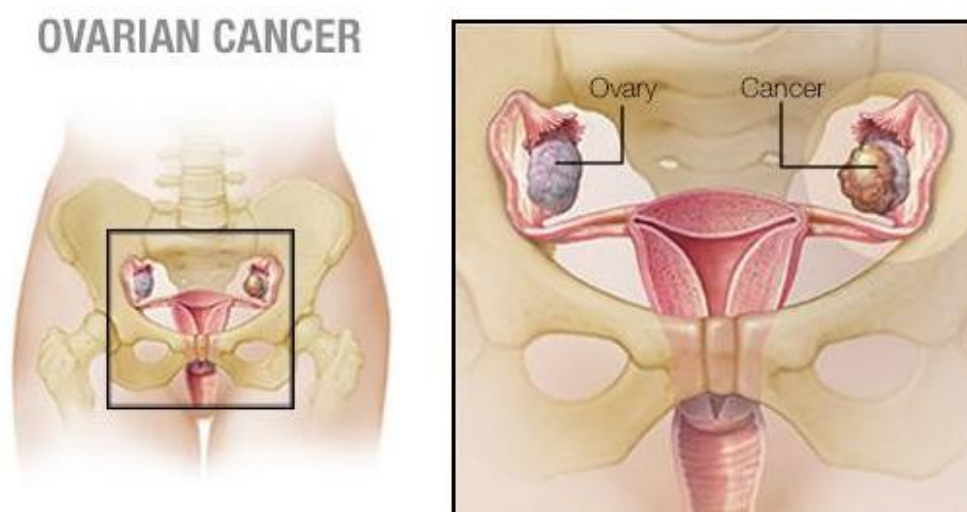
Η εργασία αυτή έλαβε χώρα στο εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ από το Σεπτέμβριο του 2018 μέχρι το Σεπτέμβριο του 2019.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΟΘΗΚΩΝ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ωοθήκες είναι οι γυναικείοι γεννητικοί αδένες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, οι οποίες βρίσκονται στο χώρο της πυέλου δεξιά και αριστερά από τη μήτρα. Στις ωοθήκες μπορούν να αναπτυχθούν πολλών ειδών κυστικοί και συμπαγείς όγκοι όπως είναι για παράδειγμα οι καλοήθεις, οι κακοήθεις ή οι όγκοι οριακής κακοήθειας.



Εικόνα 1: Απεικόνιση ωοθηκών. Αριστερά υγιής ωοθήκη και δεξιά αποθήκη που έχει προσβληθεί από καρκίνο

Οι κακοήθεις όγκοι (καρκίνος) των ωοθηκών έχουν πολλούς και διαφορετικούς τύπους εκδήλωσης αλλά και διαφορετικά χαρακτηριστικά εμφάνισης. Ο πιο συνήθης τύπος είναι ο επιθηλιακός καρκίνος, ο οποίος δημιουργείται από τη μεταλλαγή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα του επιθηλίου που περιβάλλει την ωοθήκη. Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί μία πολύπλοκη ασθένεια και μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τουλάχιστον πέντε διαφορετικούς ιστολογικούς υπότυπους που έχουν διαφορετικούς αναγνωρίσιμους παράγοντες κινδύνου, κύτταρα προέλευσης, μοριακές συνθέσεις, κλινικά χαρακτηριστικά αλλά και θεραπείες. Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ένα παγκόσμιο

πρόβλημα, λόγω του ότι η διάγνωση του γίνεται σε προχωρημένο στάδιο και δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία¹.

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ασθένεια και παραμένει η πιο θανατηφόρος γυναικολογική κακοήθεια στο δυτικό κόσμο. Το καρκίνωμα των ωοθηκών είναι η γυναικολογική κακοήθεια που συνδέεται με την υψηλότερη θνησιμότητα στις βιομηχανικές χώρες, με αναφερόμενο ποσοστό επιβίωσης 5 ετών για ποσοστό μικρότερο από 30% ².

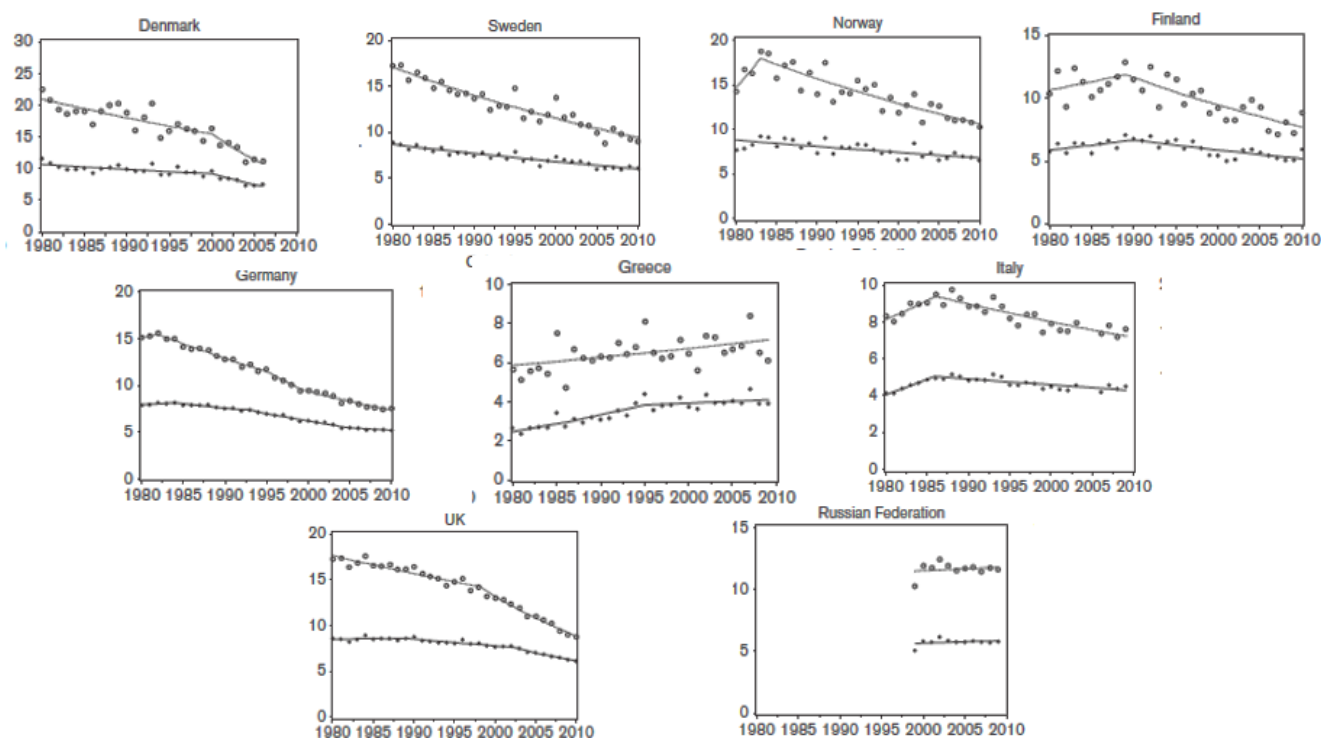
Η πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών προσδιορίζεται από συμβατικούς παράγοντες όπως το χειρουργικό στάδιο, η ιστολογική ποιότητα και ο τύπος. Εντούτοις, κανένα μοριακό προφίλ δεν βοήθησε στη ταυτοποίηση των πιο επιθετικών όγκων αλλά ούτε συνεισέφερε ως προς την καθοδήγηση κατάλληλων θεραπευτικών στρατηγικών για συγκεκριμένους ασθενείς. Επιπλέον, λόγω έλλειψης γνωστού και αξιόπιστου βιοδείκτη για τη νόσο, δεν υπάρχει επί του παρόντος πρόγραμμα ελέγχου για τον καρκίνο των ωοθηκών το οποίο να χρησιμοποιείται από την Εθνική Υπηρεσία Υγείας (*National Health Service*)³.

1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία για τον καρκίνο των ωοθηκών:

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι η κύρια αιτία της γυναικολογικής θνησιμότητας παγκοσμίως⁴. Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι μια από τις πιο συχνές γυναικολογικές κακοήθειες και έχει διαγνωστεί σε περισσότερες από 7.000 γυναίκες το 2011 στο Ηνωμένο Βασίλειο⁵. Μια επισκόπηση της “επιδημιολογίας του καρκίνου των ωοθηκών” (*Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer*) συνοψίζει τα κυριότερα αποτελέσματα στο πλαίσιο μελέτης στην Ιταλία ⁶.

Ο αριθμός των νέων περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών παγκοσμίως εκτιμάται σε περίπου 225000 το 2018 και ο αριθμός των θανάτων σε περίπου 145 000 ⁷. Τα υψηλά ποσοστά επίπτωσης (της τάξης των 10^{-12} / 100 000) εντοπίζονται στη Δυτική και τη Βόρεια Ευρώπη αλλά και στη Βόρεια Αμερική. Τα χαμηλότερα ποσοστά (κάτω από τα 3 / 100 000) παρατηρούνται στην Κίνα και την Αφρική ^{7,8,9} αν και επηρεάζονται εν μέρει ή σε μεγάλο βαθμό από τη μεταβλητή εγκυρότητα της καταχώρισης καρκίνου σε διάφορες χώρες. Οι υψηλότερες καταχωρημένες τιμές ήταν αυτές που εμφανίστηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο και τη Ρωσία⁸. Σε χώρες υψηλού κινδύνου, τα ποσοστά εμφάνισης παρέμειναν σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες, αλλά η θνησιμότητα έτεινε να μειώνεται^{10,11}. Όσον αφορά τις τάσεις

θνησιμότητας, τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα ποσοστά καρκίνου των ωοθηκών μειώθηκαν στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) ως σύνολο, η μείωση ήταν περίπου 5% σε όλες τις ηλικίες (από 6,2 έως 5,9 / 100 000, παγκόσμιο πρότυπο) και ήταν μεγαλύτερη σε γυναίκες μέσης ηλικίας, δηλαδή 35-64 χρονών (περίπου 10%, από 10,8 έως 9,9 / 100 000). Οι μειώσεις ήταν μεγαλύτερες κυρίως στη Γερμανία, στις Κάτω Χώρες, στις Σκανδιναβικές χώρες και στο Ηνωμένο Βασίλειο, δηλαδή στις χώρες όπου τα αντισυλληπτικά του στόματος (ΟΚ) χρησιμοποιούνται περισσότερο^{12,13}.



Εικόνα 2: Τάση της θνησιμότητας του καρκίνου των ωοθηκών σε μερικές ευρωπαϊκές χώρες 1980-2009¹³

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά στοιχεία των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (ΗΠΑ), περίπου 22.280 νέες περιπτώσεις συμβαίνουν κάθε χρόνο και ο προβλεπόμενος αριθμός θανάτων για το 2016 ήταν 14.240¹⁴. Είναι ενδιαφέρον ότι η ετήσια επίπτωση του καρκίνου των ωοθηκών μειώθηκε κατά 1,09% για τις γυναίκες ηλικίας μικρότερης των 65 ετών και κατά 0,95% για τις γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών μεταξύ της δεκαετίας 1998 και 2008¹⁵. Την τελευταία δεκαετία παρατηρήθηκε ελάχιστη βελτίωση στη θνησιμότητα^{16,17,18}. Η βάση δεδομένων των ΗΠΑ για την επιτήρηση, την επιδημιολογία και τα τελικά αποτελέσματα αναφέρει ότι η συνολική επιβίωση για όλους τους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών είναι 45,6% αλλά ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το στάδιο που βρίσκεται ο

ασθενής κατά την αρχική διάγνωση. Η συνολική επιβίωση 5 ετών σε ασθενείς με καρκίνο του σταδίου I είναι 92,1%, αλλά για τους ασθενείς με καρκίνο σταδίου III και IV είναι 25%¹⁴.

1.3 Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών:

Η αιτία εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών παραμένει μέχρι και σήμερα άγνωστη. Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών ή να μειώσουν την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Οι παράγοντες που έχουν μελετηθεί είναι κυρίως η γενετική, το οικογενειακό ιστορικό, η ηλικία και οι ορμονικοί παράγοντες¹. Μερικοί από τους παράγοντες που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά αναγράφονται παρακάτω. Δυστυχώς, οι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου είναι αδύνατον να αλλάξουν και να διαμορφωθούν. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων θεωρούνται το οικογενειακό ιστορικό και το γενετικό προφίλ μιας και είναι περιπτώσεις που ενυπάρχουν στο σώμα από την στιγμή της γέννησης του ατόμου.

Οι παράγοντες που έχουν στοχοποιηθεί για την αύξηση πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών είναι η ηλικία, ο γενετικός παράγοντας, η παχυσαρκία και η ορμονοθεραπεία.

1.3.1 Ηλικία:

Βιβλιογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της ηλικίας μιας γυναίκας και του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου των ωοθηκών κυρίως στη περίοδο της εμμηνόπαυσης⁶, λόγω των αλλαγών που συμβαίνουν στο DNA μέσα στους ωοθηκικούς ιστούς και μπορεί να συσσωρευτούν. Ο μέσος όρος της ηλικίας των γυναικών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο των ωοθηκών είναι περίπου τα 60 έτη.

Η υπόθεση της «συνεχούς ωορρηξίας» υποδηλώνει ότι ο αριθμός των κύκλων ωορρηξίας αυξάνει το ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης που συνδέεται με την επιδιόρθωση του επιθηλίου της επιφάνειας μετά από κάθε ωορρηξία, αυξάνοντας έτσι τις αυθόρμητες μεταλλάξεις^{19,20}.

1.3.2 Οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο των ωοθηκών ή μαστού:

Μια σειρά γενετικών παραγόντων συνδέονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Οι γενετικές μεταλλάξεις BRCA1 και BRCA2 είναι οι πιο γνωστοί γενετικοί παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο των ωοθηκών. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στο BRCA αυξάνουν τον κίνδυνο κι άλλων τύπων καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού (BRCA1 και BRCA2), ο καρκίνος του παγκρέατος (BRCA2), ο καρκίνος του προστάτη (BRCA2), το μελάνωμα (BRCA2) και ενδεχομένως ο ορμονικός καρκίνος του ενδομήτριου (BRCA1)^{21,22}.

Οι περισσότεροι υπότυποι επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών συσχετίζονται με τις μεταλλάξεις BRCA της βλαστικής σειράς, αλλά οι HGSCs είναι οι πιο συνήθεις ^{21,22} ενώ οι βλεννογόνοι υπότυποι συσχετίζονται σπάνια. Η επιβίωση βελτιώνεται για γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών που φέρουν μεταλλάξεις βλαστικών κυττάρων BRCA, σε σύγκριση με γυναίκες που έχουν καρκίνο των ωοθηκών αλλά είναι άγριου τύπου BRCA1 και BRCA2. Οι γενετικές μεταλλάξεις BRCA2 σχετίζονται με την αυξημένη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις βλαστικής σειράς BRCA1, πιθανώς διότι η BRCA2 έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στην πλατίνη και συνεπώς μεγαλύτερη απόπτωση καρκινικών κυττάρων από ότι τη BRCA1²³.

Τα γονίδια BRCA είναι απαραίτητα για την κανονική αποκατάσταση της βλάβης του διπλού έλικα του DNA μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ανεπάρκεια ομόλογου ανασυνδυασμού μπορεί να εμφανιστεί με ποσοστό έως και 50% σποραδικών καρκίνων υψηλής ραδιενέργειας, λόγω της γενετικής ή σωματικής μετάλλαξης γονιδίων BRCA, επιγενετικής σίγασης ή άλλων μεταλλάξεων που επηρεάζουν την ικανότητα ομόλογου ανασυνδυασμού²⁴. Ασθενείς με μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς BRCA έχουν συχνά όγκους οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στην πλατίνη που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη επιβίωση από ότι σε γυναίκες με σποραδικό καρκίνο των ωοθηκών¹⁸.

Υπάρχουν κι άλλες γενετικές μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA και μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών όπως για παράδειγμα τα γονίδια που ανήκουν στο μονοπάτι της αναιμίας Fanconi τα οποία είναι τα RAD51C, RAD51D, BRIP1, BARD1 και PALB2^{17,22,25}. Επίσης, οι κληρονομικές μεταλλάξεις συνδυάζονται και με άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην αποκατάσταση του DNA, όπως

είναι τα CHEK2, MRE11A, RAD50, ATM και TP53, τα οποία θα μπορούσαν επίσης να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών ^{22,25}.

Gene	Protein	Protein function
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	• Crucially involved in the repair of double-strand breaks by homologous recombination
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein	• Serves as a scaffold for other proteins involved in double-strand DNA repair, mostly through defective homologous recombination • Stabilizes RAD51–ssDNA complexes
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1	• Forms a heterodimer with BRCA1 • The BRCA1–BARD1 complex is essential for mutual stability
BRIP1	BRCA1-interacting protein 1 (also known as Fanconi anaemia group J protein)	• Binds to BRCA1 • The BRCA1–BRIP1 complex is required for S phase checkpoint activation
PALB2	Partner and localizer of BRCA2	• A bridging protein that connects BRCA1 and BRCA2 at sites of DNA damage • Helps load RAD51 onto ssDNA
RAD51C	DNA repair protein RAD51 homologue 3	• Strand exchange proteins that bind to ssDNA breaks to form nucleoprotein filaments and initiate DNA repair
RAD51D	DNA repair protein RAD51 homologue 4	
MSH2	MutS protein homologue 2	• Mismatch repair proteins that recognize and repair base-pairing errors occurring during DNA replication • Mutations in mismatch repair genes are associated with Lynch syndrome
MLH1	MutL protein homologue 1	
MSH6	MutS protein homologue 6	
PMS2	Mismatch repair endonuclease PMS2	

Εικόνα 3: Κοινές λειτουργίες των μεταλλαγμένων κληρονομικών γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών ¹

Έτσι, το πρώτο πράγμα που πρέπει να κάνει μια γυναίκα είναι να εξετάσει το οικογενειακό ιστορικό της, δηλαδή εάν η μητέρα, η γιαγιά, η αδελφή ή η θεία της είχε καρκίνο ωοθηκών σε οποιαδήποτε ηλικία ή καρκίνο του μαστού πριν από την ηλικία των 50 ετών. Αυτό θα μπορούσε να σηματοδοτήσει την παρουσία κληρονομικής τροποποίησης στο DNA της. Αυτός ακριβώς είναι ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί η κληρονομικότητα

1.3.3 Σύνδρομο Lynch - κληρονομούμενος μη πολυποδιασικός καρκίνος παχέος εντέρου (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC):

Το σύνδρομο Lynch, έχει αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα, το οποίο αντιπροσωπεύει το 10-15% κληρονομικού επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών (EOC: epithelial ovarian cancer)²⁶ και συνδέεται τυπικά με ενδομήτριο καρκίνωμα ή καρκίνωμα διαυγών κυττάρων²⁷. Το σύνδρομο Lynch συνδέεται με διάφορους καρκίνους όπως για παράδειγμα το καρκίνο του παχέος εντέρου, του ενδομήτριου ή των ωοθηκών καθώς επίσης και με καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος, του στομάχου, του λεπτού εντέρου και της χοληφόρου οδού.

Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από κληρονομικότητα μιας γενετικής μεταλλαγής στα γονίδια του συστήματος αποκατάστασης παρατυπιών DNA και συσχετίζεται με τα γονίδια MLH1, PMS2, MSH2 ή MSH6, τα οποία μεταλλάσσονται σε διαφορετικές συχνότητες^{28, 29, 30}. Οι ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch έχουν μέση ηλικία περίπου 48 έτη (σε σύγκριση με τη μέση ηλικία 68 ετών ασθενών χωρίς σύνδρομο Lynch), όπου περίπου το 50% των ασθενών έχουν καρκίνο του σταδίου I. Επιπρόσθετα, ο υπότυπος του ενδομήτριου καρκινώματος και των διαυγών καρκινικών κυττάρων είναι πιο συχνός σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch από ότι στο σποραδικό καρκίνο των ωοθηκών²⁸. Ακόμα και αν και οι δύο οδοί επισκευής BRCA και DNA δεν εμπλέκονται στην επισκευή του DNA, οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί που βασίζονται στην εμφάνιση των καρκίνων σε συγκεκριμένα όργανα και σχετίζονται με αυτά τα κληρονομικά μεταλλαγμένα γονίδια παραμένουν άγνωστοι¹.

1.3.4 Θεραπεία αντικατάστασης ορμονών (HRT: Hormone Replacement Therapy)

Η θεραπεία αντικατάστασης ορμονών έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Συγκεκριμένα, θεραπεία μόνο με οιστρογόνα αύξησε τον κίνδυνο κατά 22% ενώ η συνδυασμένη θεραπεία με οιστρογόνα και προγεστερόνη αύξησε τον κίνδυνο κατά 10%^{31,32}. Μια άλλη μελέτη αναφέρει αύξηση του κινδύνου κατά περίπου 50% στα 5 χρόνια χρήσης της ορμονοθεραπείας³³. Ωστόσο, μια μετα-ανάλυση έδειξε παρόμοια αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, συγκεκριμένα των ορωδών καρκινωμάτων και του ενδομήτριου καρκινώματος, σε γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση και χρησιμοποιούν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, ανεξάρτητα από το αν η θεραπεία

περιείχε μόνο οιστρογόνα ή συνδυασμό οιστρογόνων και προγεστερόνης. Το ρίσκο επικινδυνότητας RR (relative risk) για τους χρήστες της ορμονοθεραπείας από μια ευρωπαϊκή ανασκόπηση το 1999 ήταν 1,71 [σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (CI) 1,30-2,23]³⁴, ενώ στη συνεργατική ομάδα για τις επιδημιολογικές μελέτες του καρκίνου των ωοθηκών (*The Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer*) το 2015, αναφέρεται μια συλλογική ανασκόπηση 52 επιδημιολογικών μελετών, όπου το RR για διάρκεια μεγαλύτερη ή ίση των 5 ετών ήταν 1,34 [σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (CI) 1,28-1,41] για τους τρέχοντες χρήστες και 1,25 [σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (CI) 1,13-1,39] για τους προηγούμενους χρήστες που σταμάτησαν σε λιγότερο από 5 χρόνια. Ένας τέτοιος υπερβολικός κίνδυνος, ωστόσο, τείνει να περιορίζεται στους τρέχοντες ή πρόσφατους χρήστες και να ομαλοποιείται μετά τη διακοπή της χρήσης. Παρόλα αυτά, οι μακροχρόνιοι χρήστες (≥5 ετών) τείνουν να διατηρούν έναν μέτριο, αλλά σημαντικό κίνδυνο επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών για περισσότερο ή ίσο με 5 χρόνια διάστημα από την τελευταία χρήση⁶.

1.3.5 Παχυσαρκία:

Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει την παχυσαρκία ως πιθανό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Μια μετα-ανάλυση έδειξε αύξηση κατά 13% του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με αύξηση βάρους πέντε (5) κιλών (kg) που δεν χρησιμοποίησε ή είχε χαμηλή χρήση ορμονοθεραπείας³⁵. Επιπλέον, η παχυσαρκία συνδέεται με τον αυξημένο κίνδυνο για τους υπότυπους: ενδομήτριο καρκίνωμα και βλεννογόνο αδenoκαρκίνωμα, αλλά όχι με HGSCs³⁶.

Το υπερβολικό βάρος σχετίστηκε με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών και το μέτρο για να κριθεί μια τέτοια περίπτωση είναι ο δείκτης μάζας σώματος (BMI)²⁷. Τα δεδομένα σε μια συγκεντρωτική ανάλυση που περιλαμβάνει 25.157 περιπτώσεις απέδωσαν RR: 1,07 - 1,10 για αύξηση (πέντε) 5 kg / m² στο BMI (Body Mass Index) σε άτομα που δεν έλαβαν θεραπεία ορμονικής αντικατάστασης³⁷. Στις ανεπτυγμένες χώρες, τόσο το ύψος όσο και ο BMI έχουν αυξηθεί ως αιτίες που αναπτύσσουν τώρα την ασθένεια. Αν και όλοι οι άλλοι σχετικοί παράγοντες παρέμειναν σταθεροί, αυτές οι αυξήσεις του ύψους και του βάρους συνδέονταν με την αύξηση κατά 3% της επίπτωσης του καρκίνου των ωοθηκών ανά δεκαετία⁶.

Εκτός από τους παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, έχουν βρεθεί παράγοντες οι οποίοι μειώνουν τον κίνδυνο αυτό σε ικανοποιητικά ποσοστά. Ένας από τους καλύτερους παράγοντες αναφέρεται η φυσική δραστηριότητα, τα στοματικά αντισυλληπτικά, η γυναικολογική και αναπαραγωγική κατάσταση της γυναίκας, οι χειρουργικές επεμβάσεις πρόληψης για τον καρκίνο των ωοθηκών, η ασπιρίνη και η μεσογειακή διατροφή.

Πίνακας 1: Συνοπτικός πίνακας με τους παράγοντες που επηρεάζουν τον καρκίνο των ωοθηκών

	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ		ΑΝΑΦΟΡΕΣ
		ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	
1	Ηλικία	✓		6,19,20
2	Οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο των ωοθηκών ή μαστού:	✓		17,18,21,22,23,24,25
3	Σύνδρομο Lynch	✓		1,26,27,28,29,30
4	Θεραπεία αντικατάστασης ορμονών	✓		6,31,32,33,34
5	Παχυσαρκία	✓		6,27,35,36
6	Στοματικά αντισυλληπτικά		✓	38,39,40,41
7	Μητρότητα - θηλασμός:		✓	6
8	Γυναικολογικό χειρουργείο:		✓	42,43
9	Ασπιρίνη		✓	40,44
10	Μεσογειακή διατροφή:		✓	10,45,46,47
11	Άσκηση και φυσική κατάσταση:		✓	48,49

1.3.6 Στοματικά αντισυλληπτικά:

Η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών από το στόμα έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών σε άτομα με μετάλλαξη BRCA1, καθώς και σε άτομα χωρίς γενετική προδιάθεση³⁸. Μία μετα-ανάλυση έδειξε μείωση κατά 0,54% του καρκίνου των ωοθηκών στη περίπτωση της χρήσης από του στόματος αντισυλληπτικών χαπιών με μέσο όρο τα 5 έτη^{38,39}. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι μια ανάλυση από την Ovarian Cancer Cohort Consortium, όπου συμπεριλαμβάνονται τα δεδομένα από 21 μελέτες με 1,3 εκατομμύρια γυναίκες και 5,584 γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών, έδειξε ότι η χρήση αντισυλληπτικών από το στόμα χαπιών συσχετίστηκε με τη μείωση του ορώδους και ενδομήτριου καρκινώματος, των διαυγών καρκινικών κυττάρων, αλλά όχι του βλεννογόνου αδενοκαρκινώματος⁴⁰.

Οι σχετικές δόσεις οιστρογόνου και προγεστερόνης που βρίσκονται στα αντισυλληπτικά χάπια δεν επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών αλλά η μεγάλη

διάρκεια της χρήσης αντισυλληπτικών από το στόμα σχετίζεται με το μειωμένο κίνδυνο¹. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα αντισυλληπτικά χάπια έχουν ήδη επηρεάσει την εμφάνιση περίπου 200 000 περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών και 100 000 θανάτων από την συγκεκριμένη ασθένεια⁴¹.

1.3.7 Μητρότητα - θηλασμός:

Οι γυναίκες που έχουν γεννήσει έχουν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών για όλους τους υπότυπους σε σύγκριση με άτεκνες γυναίκες, με μεγαλύτερη μείωση κινδύνου στα διαυγή καρκινικά κύτταρα¹. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι η μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών σχετίζεται με τον αριθμό των παιδιών που γεννάει μια γυναίκα. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του θηλασμού, η ωορρηξία διακόπτεται προσωρινά και έτσι η μείωση του αριθμού των κύκλων ωορρηξίας κατά τη διάρκεια της ζωής, πιστεύεται ότι μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών⁶.

1.3.8 Ωοθηκεκτομή:

Η μονομερής ωοθηκεκτομή συνδέεται με μείωση κατά 30% του κινδύνου καρκίνου των ωοθηκών, η οποία δεν είναι συγκεκριμένη για τον ιστολογικό υπότυπο. Η διμερής ωοθηκεκτομή είναι επίσης αποτελεσματική στη μείωση του κινδύνου καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες με γενετική προδιάθεση. Είναι ενδιαφέρον ότι καμία γυναίκα με μετάλλαξη BRCA2 και 1,1% με μετάλλαξη BRCA1 ανέπτυξε πρωτογενές περιτοναϊκό καρκίνωμα μετά από διμερή ωοθηκεκτομή^{42, 43}.

1.3.9 Ασπιρίνη:

Η χρήση ασπιρίνης συνδέθηκε με το μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, ιδιαίτερα μεταξύ των γυναικών που λαμβάνουν καθημερινά χαμηλή δόση ασπιρίνης, ανεξάρτητα από την ηλικία τους. Η τακτική χρήση ασπιρίνης συσχετίστηκε με τον μειωμένο κίνδυνο για τους υπότυπους του ενδομήτριου καρκινώματος και του βλεννογόνου αδενοκαρκινώματος με πολύ σημαντική μείωση του κινδύνου εμφάνισης των ορωδών καρκινωμάτων^{40,44}.

1.3.10 Μεσογειακή διατροφή:

Οι διατροφικές πηγές διαφόρων λιπαρών οξέων είναι πολυάριθμες και ποικίλες και διάφορα λίπη που προστίθενται περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία διαφορετικών λιπαρών οξέων⁴⁵.

Η σύνθεση των προστιθέμενων λιπών, όπως είναι το ελαιόλαδο φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη δυνητικά ευνοϊκή επίδραση μιας μεσογειακής δίαιτας στα νεοπλάσματα των γυναικείων ορμονών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου των ωοθηκών^{46,47}. Τα διαφορετικά πρότυπα κατανάλωσης λίπους σε μεσογειακές χώρες (Ιταλία, Ισπανία, Ελλάδα) θα μπορούσαν τουλάχιστον εν μέρει να είναι υπεύθυνα για τα σχετικά χαμηλά ποσοστά καρκίνου των ωοθηκών στις χώρες αυτές, σε σύγκριση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες¹⁰.

Στην *εικόνα 4*, παρουσιάζεται πίνακας από την μελέτη με 1031 περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών και 2411 υγιείς μάρτυρες για τα κατά προσέγγιση ποσοστά της πρόσληψης διαφόρων λιπών που προστίθενται, όπως είναι για παράδειγμα το ελαιόλαδο, των σπορέλαιων, του βουτύρου και της μαργαρίνης⁴⁵

Added fat	Quintile of intake			
	2	3	4	5
Olive oil				
OR	1.03	0.78	0.84	0.68
95% CI	0.77–1.38	0.57–1.07	0.62–1.14	0.50–0.93
Specific seed oils				
OR	0.78	0.59		
95% CI	0.61–0.99	0.46–0.76		
Mixed seed oils				
OR	1.03	0.86	0.64	0.80
95% CI	0.79–1.35	0.64–1.17	0.46–0.87	0.58–1.09
Butter				
OR	0.94	0.80	0.78	1.04
95% CI	0.72–1.23	0.59–1.08	0.57–1.06	0.78–1.39
Margarine				
OR	0.85			
95% CI	0.59–1.21			

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Εικόνα 4: Η σχέση μεταξύ κατανάλωσης ελαιόλαδου και κινδύνου καρκίνου των ωοθηκών⁴⁵

1.3.11 Άσκηση και φυσική κατάσταση:

Η άσκηση και η καλή φυσική κατάσταση χαρίζει γενικά οφέλη για την υγεία, τα οποία είναι καλά εδραιωμένα. Όσον αφορά τον καρκίνο των ωοθηκών, αναμένεται, τουλάχιστον έμμεσα να επιδρά θετικά, μέσω της επακόλουθης μείωσης του λιπώδους ιστού και συνεπώς των επιπέδων οιστρογόνων και της μείωσης της χρόνιας φλεγμονής⁴⁸. Τα αποτελέσματα δεν είναι απολύτως εκτιμώμενα, αλλά η μετα-ανάλυση του 2007⁴⁹ υπολόγισε ότι ο χαμηλότερος κίνδυνος είναι σχεδόν 20% για τις πιο δραστικές γυναίκες σε σχέση με τις λιγότερο δραστικές (συγκεντρωτικός σχετικός κίνδυνος = 0,81, 95% CI: 0,72-0,92).

1.4 Διάγνωση:

Πρόσφατες μελέτες ελέγχου ρουτίνας έδειξαν ότι οι γυναίκες γενικά έχουν αρκετά επίμονα ή συχνά εμφανιζόμενα μη ειδικά συμπτώματα τα οποία δεν είναι χαρακτηριστικά και ενδεικτικά, αλλά ασαφή και κοινά σε πολλές άλλες ασθένειες. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν την πυελική ή κοιλιακή δυσφορία, την πίεση, τον πόνο, αίσθημα κοιλιακής διόγκωσης. Επίσης αίσθημα πληρότητας ή απώλεια όρεξης αλλά και αλλαγές στις συνήθειες του εντέρου και στο πρότυπο ούρησης. Καθώς ο καρκίνος εξελίσσεται σε μεταγενέστερο στάδιο γίνονται εμφανή κι άλλα συμπτώματα πιο έντονα, όπως είναι: η διάταση της κοιλιακής περιοχής λόγω συσσώρευσης υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα (ασκίτης), η απόφραξη εντέρου λόγω μάζας στην κοιλία και η δυσκολία στο αναπνευστικό σύστημα λόγω συσσώρευσης υγρού γύρω από τους πνεύμονες^{50,51}.

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων γενικής πρακτικής φαίνεται ότι κατά μέσο όρο μία στις δύο γυναίκες ηλικίας 45 έως 70 ετών συμβουλευεται το γενικό ιατρό της κάθε χρόνο με αυτά τα συμπτώματα⁵². Πράγματι, ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ένας από τους καρκίνους που χαρακτηρίζεται ως ο "πιο δύσκολος στο να υποψιαστεί κάποιος" ⁵³.

Τα επίπεδα CA-125 (CA-125: cancer antigen) παρακολουθούνται μετά την ολοκλήρωση της αρχικής θεραπείας, αλλά οι οδηγίες σχετικά με τη συχνότητα του CA-125 και την κλινική παρακολούθηση των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών αλλάζουν με διαφορετικές οδηγίες.

Η Εταιρεία Γυναικολογικής Ογκολογίας (Society of Gynecologic Oncology) συστήνει την ανασκόπηση των κλινικών συμπτωμάτων και τη φυσική εξέταση των ασθενών μετά την αρχική θεραπεία για καρκίνο των ωοθηκών κάθε 3 μήνες με προαιρετικό έλεγχο του βιοδείκτη CA-125 και ακτινογραφική απεικόνιση με τις τεχνικές CT (*Computed Tomography*), PET (*Positron Emission Tomography*) ή MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) σε ασθενείς με υποψία υποτροπής και αυξημένα επίπεδα CA-125 ⁵⁴.

Αντίθετα, οι κατευθυντήριες γραμμές του National Comprehensive Cancer Network συστήνουν επισκέψεις παρακολούθησης σε γιατρό κάθε 2-4 μήνες για 2 χρόνια μετά τη θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης των επιπέδων CA-125. Η ακτινογραφική απεικόνιση θα πρέπει να γίνεται εάν υπάρχει υποψία για επανεμφάνιση του καρκίνου των ωοθηκών¹.

Η καθοδήγηση από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Αλληλεγγύης στο Ηνωμένο Βασίλειο (NICE: National Institute for Health and Care Excellence in the UK) συνιστά τη

συνεχή εξέταση του βιοδείκτη CA-125 σε συνδυασμό με το υπερηχογράφημα κοιλιάς εάν τα επίπεδα CA-125 στον ορό είναι μεγαλύτερα από $> 35 \text{ IU / L}$ ^{55,56}. Εάν τα συμπτώματα επιμένουν εν απουσία της αυξημένης συγκέντρωσης του αντιγόνου CA-125, πρέπει να ρυθμιστεί ένα χαμηλό όριο ώστε να προχωρήσει σε πυελικό υπερηχογράφημα.

1.4.1 CA-125:

Το CA-125 είναι ένα αντιγονικός βιοδείκτης, μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους που αναγνωρίζεται από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας μια καρκινική κυτταρική σειρά των ωοθηκών ως ανοσογόνο. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 5 ετών οι μελέτες που ανασκοποούνται στο άρθρο των Jacobs and Bast et al.⁵⁷ έδωσαν πληροφορίες σχετικά με τη φύση, την κατανομή και την κλινική σημασία του CA 125. Ο βιοδείκτης CA-125 εκφράζεται από επιθηλιακούς όγκους των ωοθηκών και από διάφορους άλλους παθολογικούς και φυσιολογικούς ιστούς. Η λειτουργία της γλυκοπρωτεΐνης που εκφράζει το CA-125 παραμένει ασαφής αλλά η κατανομή του αντιγόνου υποδηλώνει ότι μπορεί να έχει φυσιολογικό ρόλο.

Επί του παρόντος, το καρκινικό αντιγόνο 125 (CA-125) είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος δείκτης όγκου στον ορό για τον καρκίνο των ωοθηκών. Ωστόσο, έχει ευαισθησία σε ποσοστό 50 - 60% για την ανίχνευση της νόσου σε πρώιμο στάδιο σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες⁵⁸. Το CA-125 είναι επίσης ψευδώς θετικό σε καλοήθεις γυναικολογικές παθήσεις όπως είναι η εγκυμοσύνη και η ενδομητρίωση⁵⁷.

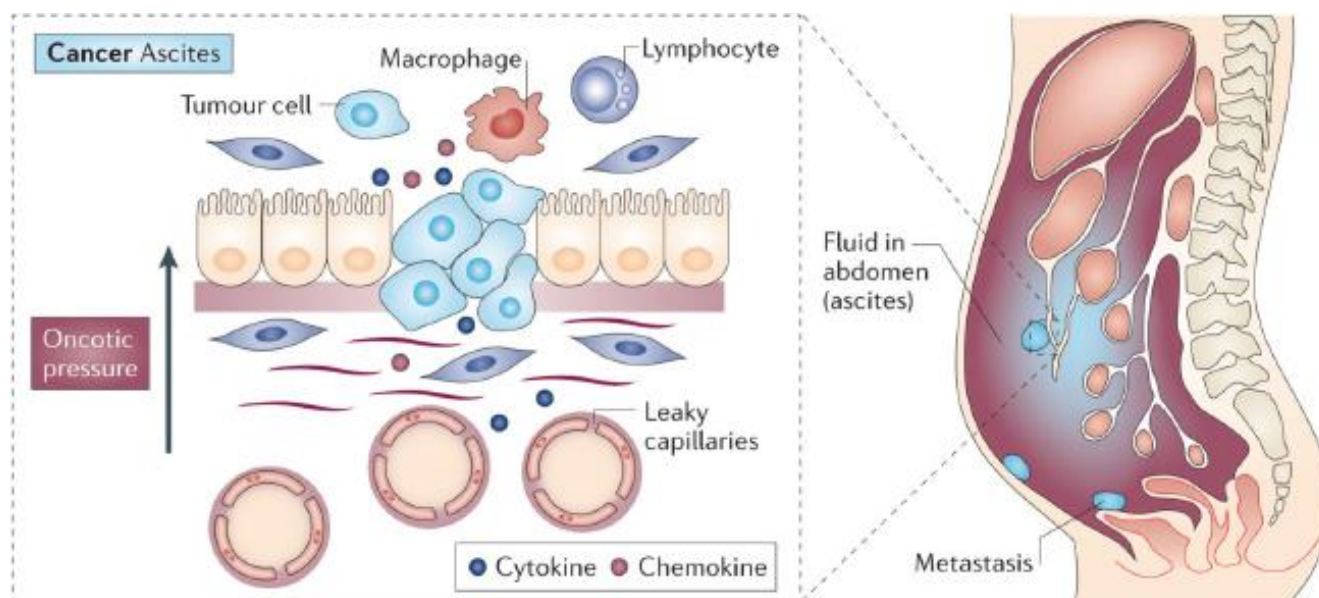
1.4.1.1 Ασκήτης:

Ο κακοήθης ασκίτης παρουσιάζει μια σημαντική κλινική πρόκληση για τη διαχείριση του καρκίνου των ωοθηκών, αλλά παρέχει επίσης και πλούσιες ευκαιρίες για μεταγραφική έρευνα. Η προσβασιμότητα του ασκητικού υγρού και των κυτταρικών συστατικών του καθιστά μια εξαιρετική πηγή ιστικού όγκου για τη διερεύνηση διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών και για την ανάλυση του μοριακού προφίλ⁵⁹.

Ο ασκίτης προκαλείται από πολλές παθολογίες, με πιο συχνή την κίρρωση του ήπατος σε ποσοστό 81% των περιπτώσεων⁶⁰, την καρδιακή ανεπάρκεια (3%) και τη φυματίωση (2%), ενώ σημαντική μειονότητα (10%) σχετίζεται με κακοήθεια. Σε ασθενείς με όγκους στην κοιλιακή κοιλότητα, η περιοχή εγκάρσιας διατομής που φέρουν την περιτοναϊκή

κοιλότητα αυξάνεται και αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη επιφάνεια διήθησης για το υγρό. Επιπλέον, ο κακοήθης ασκίτης έχει υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι δευτερεύουσα στην αυξημένη τριχοειδή διαπερατότητα. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες και οι χημειοκίνες, καθώς και η μειωμένη λεμφική ροή, συμβάλλουν σε όλες τις αλλοιώσεις της περιτοναϊκής μεμβράνης. Αυτές οι αλλαγές μειώνουν τη διαφορά της πλάσματος στο περιτοναϊκό ογκολογικό επίπεδο και έτσι η κατεύθυνση της ροής του υγρού είναι στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία παθολογικών όγκων υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα⁵⁹.

Η πιο συνηθισμένη πρωτογενής περιοχή του καρκίνου που σχετίζεται με ασκίτη είναι η ωοθηκική, που αντιπροσωπεύει το 38% των κακοήθων ασκίτη που εμφανίζεται στις γυναίκες⁶¹. Οι ασθενείς με άλλες κοιλιακές επιθηλιακές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του παγκρεατικού και του γαστρικού καρκίνου, αναπτύσσουν ασκίτη σε 21% και 18,3% των περιπτώσεων, αντίστοιχα⁶². Ο κακοήθης ασκίτης μπορεί επίσης να αναπτυχθεί ως δευτεροπαθής σε εξω-κοιλιακούς όγκους, όπως ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα, καθώς και το λέμφωμα ⁵⁹.



Εικόνα 5: Ο καρκίνος αλλάζει το περιβάλλον που αναπτύσσεται και τη φυσιολογική λειτουργία, δημιουργία ασκίτη. Ο ασκίτης είναι η περίσσεια συσσώρευσης υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες και οι χημειοκίνες, καθώς και η μειωμένη λεμφική ροή, συμβάλλουν όλες στις αλλοιώσεις της περιτοναϊκής μεμβράνης κι έτσι μειώνουν τη διαφορά του πλάσματος στο περιτοναϊκό επίπεδο του όγκου, έτσι ώστε η κατεύθυνση της ροής του υγρού να είναι στην περιτοναϊκή κοιλότητα⁵⁹.

Μια μελέτη έδειξε ότι ο ασκίτης είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για το χρόνο έως την υποτροπή και περισσότερες από το ένα τρίτο των γυναικών με καρκίνο των ωοθηκών αναπτύσσουν ασκίτη κατά τη διάρκεια της νόσου τους⁶² και αυτό δεν περιορίζεται σε κανένα συγκεκριμένο ιστολογικό στοιχείο. Αν και ορισμένοι ογκολόγοι θεωρούν ότι η συχνότητα εμφάνισης ασκίτη μπορεί να μειώνεται με την ευρεία χρήση χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με ενσωμάτωση από ταξάνες, δεν υπάρχουν δημοσιευμένα υποστηρικτικά δεδομένα. Σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, ο ασκίτης αντιμετωπίζεται ουσιαστικά μέσω της θεραπείας της υποκείμενης νόσου, δηλαδή χρησιμοποιώντας ενδοφλέβια χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Εντούτοις, όταν έχει αναπτυχθεί χημειοανθεκτικότητα, ο ασυμπτωτικός ασκίτης μπορεί να είναι μείζον πρόβλημα και η πλειονότητα των ασθενών να πρέπει να υποβάλλονται σε συχνή παρακέντηση για την προσωρινή ανακούφιση των συμπτωμάτων. Οι νεότερες στρατηγικές για τον έλεγχο του ασκίτη, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας με αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF: Vascular endothelial growth factor) αποδεικνύονται πολλά υποσχόμενες, αλλά υπάρχει επείγουσα ανάγκη για περαιτέρω κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ασκίτη, ώστε να αναπτυχθεί μια πιο αποτελεσματική θεραπεία⁵⁹.

1.4.2 Χειρουργική επέμβαση

Ο σκοπός της χειρουργικής επέμβασης είναι η παροχή ιστοπαθολογικής διάγνωσης, η απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων καρκινικών ιστών και η καθιέρωση του σταδίου βάσει τη FIGO, η οποία πρόσφατα ενημερώθηκε⁶³. Η ιστοπαθολογική διάγνωση του όγκου και το στάδιο της νόσου θεωρούνται κρίσιμα και καθοριστικά στάδια καθώς παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατάσταση της ασθενούς και κρίνουν την πορεία της θεραπείας.

I	Tumor confined to ovaries or fallopian tube(s)	T1
IA	Tumor limited to one ovary (capsule intact) or fallopian tube, No tumor on ovarian or fallopian tube surface No malignant cells in the ascites or peritoneal washings	T1a
IB	Tumor limited to both ovaries (capsules intact) or fallopian tubes No tumor on ovarian or fallopian tube surface No malignant cells in the ascites or peritoneal washings	T1b
IC	Tumor limited to one or both ovaries or fallopian tubes, with any of the following: IC1 Surgical spill intraoperatively IC2 Capsule ruptured before surgery or tumor on ovarian or fallopian tube surface IC3 Malignant cells present in the ascites or peritoneal washings	T1c
II	Tumor involves one or both ovaries or fallopian tubes with pelvic extension (below pelvic brim) or peritoneal cancer (Tp)	T2
IIA	Extension and/or implants on the uterus and/or fallopian tubes/and/or ovaries	T2a
IIB	Extension to other pelvic intraperitoneal tissues	T2b
III	Tumor involves one or both ovaries, or fallopian tubes, or primary peritoneal cancer, with cytologically or histologically confirmed spread to the peritoneum outside the pelvis and/or metastasis to the retroperitoneal lymph nodes	T3
IIIA	Metastasis to the retroperitoneal lymph nodes with or without microscopic peritoneal involvement beyond the pelvis	T1,T2,T3aN1
IIIA1	Positive retroperitoneal lymph nodes only (cytologically or histologically proven)	
IIIA1(i)	Metastasis ≤ 10 mm in greatest dimension (note this is tumor dimension and not lymph node dimension)	T3a/T3aN1
IIIA1(ii)	Metastasis > 10 mm in greatest dimension	
IIIA 2	Microscopic extrapelvic (above the pelvic brim) peritoneal involvement with or without positive retroperitoneal lymph nodes	T3a/T3aN1
IIIB	Macroscopic peritoneal metastases beyond the pelvic brim ≤ 2 cm in greatest dimension, with or without metastasis to the retroperitoneal lymph nodes	T3b/T3bN1
IIIC	Macroscopic peritoneal metastases beyond the pelvic brim > 2 cm in greatest dimension, with or without metastases to the retroperitoneal nodes (Note 1)	T3c/T3cN1
IV	Distant metastasis excluding peritoneal metastases	
	Stage IV A: Pleural effusion with positive cytology	Any T, Any N,
	Stage IV B: Metastases to extra-abdominal organs (including inguinal lymph nodes and lymph nodes outside of abdominal cavity) (Note 2)	M1
	(Note 1: includes extension of tumor to capsule of liver and spleen without parenchymal involvement of either organ)	T3c/T3cN1)
	(Note 2: Parenchymal metastases are Stage IV B)	

Εικόνα 6: Οι αλλαγές που έγιναν από τη Διεθνή Ομοσπονδία Γυναικολογίας και Μαιευτικής (FIGO) στην ταξινόμηση του καρκίνου των ωοθηκών⁶⁴

Η χειρουργική επέμβαση θα πρέπει να περιλαμβάνει μια ολική υστερεκτομή, αμφίπλευρη σαλπιγγειο-ωοθηκεκτομή, αποκόλληση όγκων και οστεκτομή⁶⁵. Η λεμφαδενεκτομή είναι απαραίτητη για τη σταδιοποίηση της φάσης σύμφωνα με τη FIGO, αλλά τα αποτελέσματα των δοκιμών δεν έχουν δείξει ότι η εκτεταμένη οπισθοπεριτοναϊκή λεμφαδενοεκτομή προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης⁶⁶.

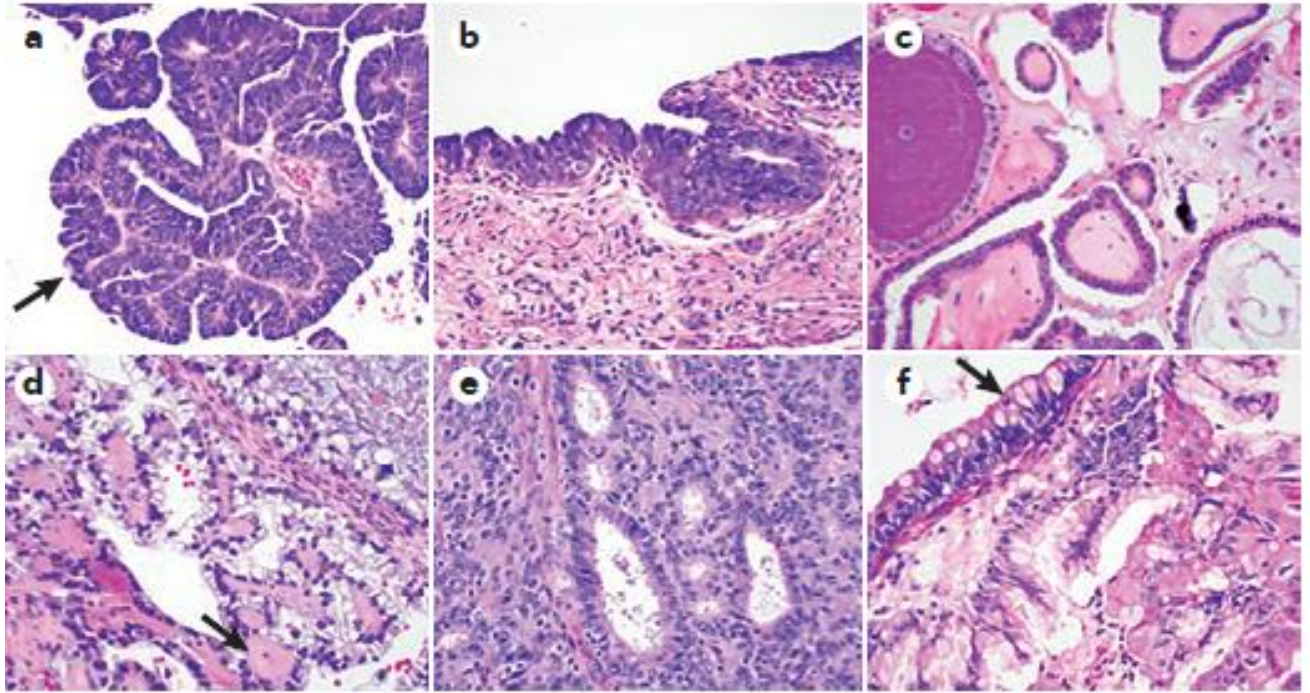
1.5 Υπότυποι του καρκίνου των ωοθηκών:

Ο καρκίνος των ωοθηκών περιλαμβάνει μια συλλογή νεοπλασμάτων με διαφορετικά κλινικο-παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά και διαφορετική πρόγνωση. Παρά την ύπαρξη μιας ποικιλίας υπότυπων καρκίνων των ωοθηκών, αυτές αντιμετωπίζονται κατά κύριο λόγο ως μία και μόνη ασθένεια. Έχουν καταβληθεί τεράστιες προσπάθειες για το χαρακτηρισμό αυτών των υπότυπων και την αναγνώριση βιοδεικτών για θεραπευτικές στρατηγικές⁶⁷.

Epithelial ovarian cancer				
High-grade serous	Low-grade serous	Endometrioid	Clear cell	Mucinous
TP53 BRCA1/2 NF1 CDK12 Homologous Recombination Repair genes Pathway alterations PI3/Ras/Notch/ FoxM1	BRAF KRAS NRAS ERBB2	ARID1A PI3KCA PTEN PPP2R1A MMR deficiency	ARID1A PI3KCA PTEN CTNNB1 PPP2R1A	KRAS ERBB2 ampl

Εικόνα 7: Ιστολογικοί υπότυποι επιθηλιακού καρκινώματος των ωοθηκών και συναφείς μεταλλάξεις / μοριακές ατέλειες με την άδεια της AACR⁶⁷.

Όπως και σε άλλους τύπους καρκίνου, η ετερογένεια του όγκου φαίνεται να είναι πολύ υψηλή σε όλους τους υπότυπους⁶⁸. Οι πέντε σημαντικοί υπότυποι έχουν φανερώσει ότι έχουν συγκεκριμένα γενετικά χαρακτηριστικά και πρέπει να αντιμετωπίζονται ως διακριτές ασθένειες κι όχι ως μια ενιαία.



Εικόνα 8: Ιστολογικοί υπότυποι καρκίνου των ωοθηκών¹:

α) HGSC: υψηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα, β) STIC: σωληνοειδές ενδοεπιθηλιακό ορώδες καρκίνωμα, γ) LGSC: χαμηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα, δ) CCC, διαυγές καρκινικά κύτταρα ε) Endometrioid Adenocarcinoma: ενδομήτριο καρκίνωμα, ς) Mucinus Adenocarcinoma: βλεννογόνο αδενοκαρκίνωμα

1.5.1 HGSC: ΥΨΗΛΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Ο υπότυπος HGSC περιλαμβάνει το 85-90% των περιπτώσεων ορώδες καρκινώματος (SC), το οποίο είναι το μεγαλύτερο ποσοστό διάγνωσης για καρκίνο των ωοθηκών. Συνήθως εμφανίζονται σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Ανιχνεύονται σε προχωρημένο στάδιο και ευθύνονται για την πλειοψηφία των θανάτων από καρκίνο ωοθηκών. Μορφολογικά, ο υπότυπος HGSC αποτελείται από κυλινδρικά, σοβαρή πυρηνική άτυπη κατάσταση, υψηλή αναλογία πυρηνικής προς κυτταροπλασματική και άφθονες μιτώσεις. Το γονίδιο p53 γενικά μεταλλάσσεται, με αποτέλεσμα υπερέκφραση ή στην περίπτωση μηδενικής μετάλλαξης, μπορεί να είναι εντελώς αρνητική. Παραδόξως, γενετική ανάλυση μεγάλης κλίμακας του HGSC αποκάλυψε μόνο μερικά επαναλαμβανόμενα μεταλλαγμένα γονίδια, όπως τα TP53 και BRCA1 - BRCA2 που εμπλέκονται σε τουλάχιστον 96 και 22% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Το γονίδιο TP53 είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο με ενθέσεις και απαλοιφές στο πλαίσιο ανάγνωσης. Επίσης, συσχετίστηκαν κι άλλα γονίδια τα οποία ήταν στατιστικά επαναλαμβανόμενα αλλά με χαμηλή συχνότητα <10% ⁶⁹ και αυτά

είναι τα: BRCA1, AURKA, ERBB3, CDK2, MTOR, BRD4 και MYC. Οι ομόλογοι ανασυνδυασμοί είναι ελαττωματικοί σε περίπου 50% του HGSC⁷⁰. Το HGSC παρουσιάζει σχετικά υψηλό αριθμό παραλλαγών σωματικού αριθμού αντιγράφων και δομικές παραλλαγές με μεγαλύτερο από 100 επαναλαμβανόμενες αναγνωρισμένες ενισχύσεις και διαγραφές^{71, 72, 73}. Διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά και διάφορα μορφολογικά μοντέλα του HGSC έχουν περιγραφεί και συνδέονται με συγκεκριμένες γονιδιωματικές μεταλλάξεις, όπως το BRCA1 - BRCA2, που προσφέρουν καλύτερη πρόγνωση, αλλά αυτό πρέπει ακόμη να επικυρωθεί^{74, 75}. Μπορεί επίσης να υποδιαιρεθεί σε άλλους υπότυπους: διαφοροποιημένοι, ανοσοαντιδραστικοί, μεσεγχυματικοί και πολλαπλασιαστικοί^{76, 77, 78}.

1.5.2 LGSC: ΧΑΜΗΛΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Σε αντίθεση με το HGSC, οι LGSC είναι σπάνιες, αντιπροσωπεύοντας το ποσοστό 10-15% των ορώδων καρκινωμάτων (SC) και το 2% όλων των καρκινωμάτων των ωοθηκών. Η διάγνωση γίνεται σε νεότερη ηλικία περίπου 43-55 ετών, ως πρώιμο ή μεταγενέστερο στάδιο. Πρόκειται για βραδέως αναπτυσσόμενους όγκους με ποσοστό επιβίωσης 50% στα 10 έτη⁷⁹. Μορφολογικά, μοιάζει με HGSC έχει όμως δικά του συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως η ήπια πυρηνική άτυπη κατάσταση, είναι χαμηλότερη αναλογία πυρηνικής προς κυτταροπλασματική και έχει γονιδιωματική σταθερότητα. Σε μοριακό επίπεδο, το LGSC είναι γονιδιωματικά σταθερό και φιλοξενεί σωματικές μεταλλάξεις σε KRAS και BRAF σε περίπου μισές περιπτώσεις^{79, 80}. Δεν ανταποκρίνονται περισσότερο στη χημειοθεραπεία από τους HGSCs ασθενείς αφού υπάρχουν μελέτες που περιγράφουν χαμηλά ποσοστά ανταπόκρισης σε κυτταροτοξικούς και ορμονικούς παράγοντες. Ως αποτέλεσμα, δεν υπάρχουν προγνωστικοί βιοδείκτες που να κατευθύνουν τη θεραπεία. Οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται είναι οι ορμονικές θεραπείες και οι αναστολείς MEK, η οποία βρίσκεται ακόμη υπο κλινικές δοκιμές⁸¹.

1.5.3 STIC: ΣΩΛΗΝΟΕΙΔΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟ ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Ο υπότυπος STIC θεωρείται ως πρόδρομος υπότυπος του HGSC και εντοπίζεται στο 18-60% των περιπτώσεων HGSCs με προχωρημένο στάδιο το οποίο μπορεί να φθάσει μέχρι και το 80% των πρώιμων HGSCs⁸². Δεν υπάρχουν STICs σε όλους τους ασθενείς με HGSCs. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του είναι ίδια με το HGSC όμως με σοβαρή ατυπία, μτώσεις και έλλειψη πολικότητας. Υπάρχουν εναλλακτικές οδοί για την παθογένεση του HGSC σε σχέση με HGSCs¹.

1.5.4 CLEAR-CELL CARCINOMA (CCC): ΔΙΑΥΓΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, γνωστός με το διεθνές αρκτικόλεξο WHO (World Health Organization), ορίζει τα CCC ως νέο υπότυπο του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών το 1973⁸³. Τα CCC είναι σπάνιος υπότυπος, αντιπροσωπεύονται μόλις 3,7-12,1% του συνόλου των επιθηλιακών καρκίνου των ωοθηκών. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι τα CCC έχουν τη χειρότερη πρόγνωση όλου του συνόλου του καρκίνου των ωοθηκών⁸⁴ παρόλο που δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν οποιαδήποτε προγνωστική διαφορά στην HGSC⁸⁵. Τα CCC εμφανίζονται σε νεότερη ηλικία από την SC και έχουν σαφή σχέση με την ενδομητρίωση^{86, 87}. Αυτοί οι όγκοι συνήθως εμφανίζονται ως μεγάλη πυελική μάζα και σπάνια εμφανίζονται διμερώς. Συσχετίζονται συχνά με θρομβοεμβολικές επιπλοκές και υπερασβεστιαμία με υψηλότερη συχνότητα μεταστάσεων από λεμφαδένες σε σχέση με την SC⁸⁸. Ιστολογικά, τα διαυγή καρκινικά κύτταρα αποτελούνται από διαυγή κύτταρα γλυκογόνου μεγάλα, κυβοειδείς, καρφωμένα ή πεπλατυσμένα. Συχνά εμφανίζουν μια πρόσμειξη μοτίβων ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων των στερεών, σωληνοκυτταρικών ή θηλωμάτων⁸⁹. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο καταστολέας όγκου ARID1A μεταλλάσσεται σε σχεδόν στο μισό των περιπτώσεων των διαυγών καρκινικών κυττάρων^{90,91}. Έχουν επίσης αναφερθεί ενεργοποιήσεις μεταλλάξεων στο PI3KCA⁹². Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα CCC είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, αλλά η διαχείριση των CCC είναι η ίδια με εκείνη των υπόλοιπων επιθηλιακών καρκίνων των ωοθηκών¹.

1.5.5 ENDOMETRIOID ADENOCARCINOMA: ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

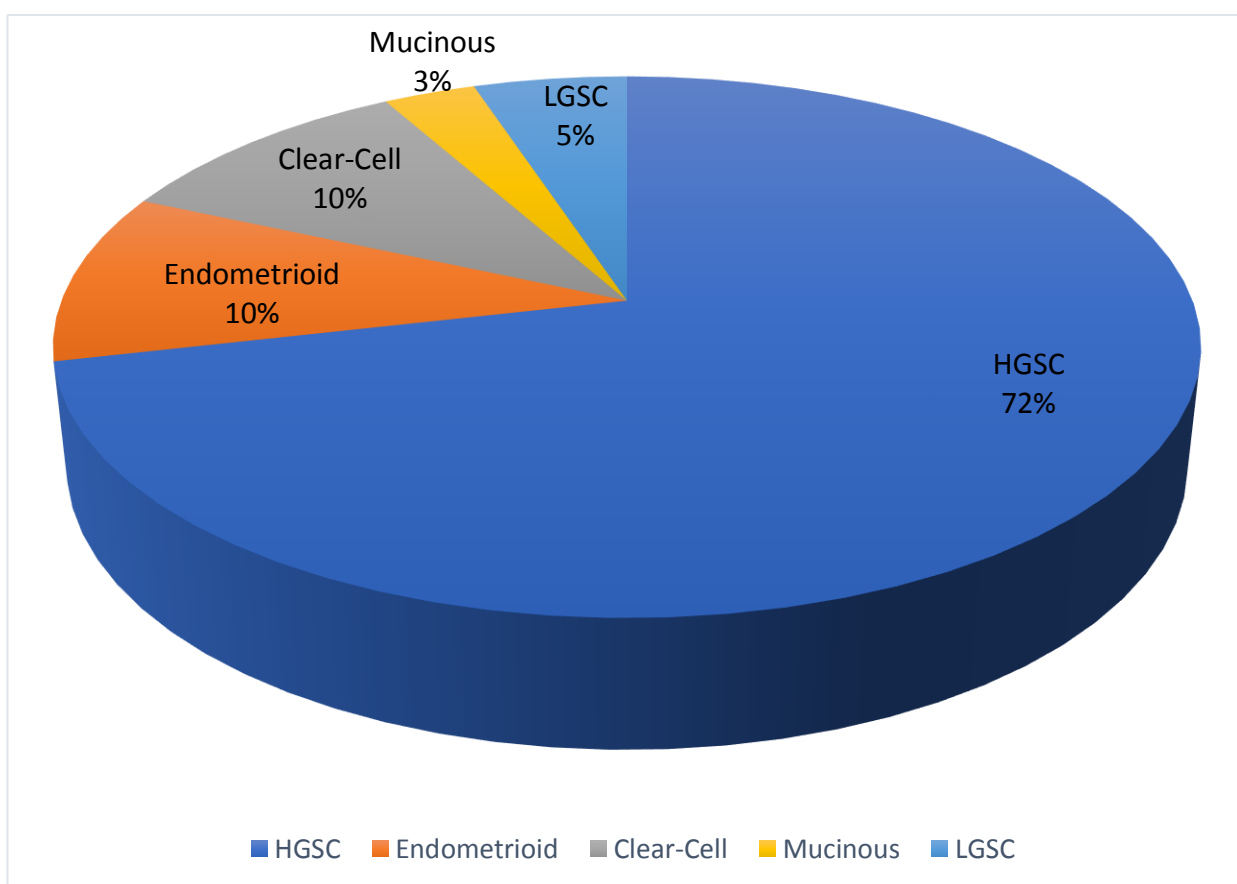
Το ενδομήτριο καρκίνωμα αντιπροσωπεύει το 10% όλων των καρκινωμάτων των ωοθηκών και είναι συνήθως μονομερείς στερεές μάζες. Αυτοί οι όγκοι παρουσιάζονται σε χαμηλό βαθμό και σχετίζονται με καλή πρόγνωση. Ιστολογικά, αποτελούνται από αδένες που μοιάζουν με ενδοθηλιακό επιθήλιο. Εμφανίζουν ως επί το πλείστον μια αδενική αρχιτεκτονική με πλακώδη διαφοροποίηση και βαθμονομούνται με βάση τη κυτταρική αρχιτεκτονική τους και την πυρηνική ατυπία. Υπάρχουν τρεις (3) βαθμοί σύμφωνα με το σύστημα της FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), το οποίο βασίζεται στην παρουσία στερεών περιοχών και πυρηνικών ατυπιών. Αυτός ο υπότυπος είναι ο συχνότερος σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch. Έχουν αναφερθεί σποραδικές περιπτώσεις που παρουσιάζουν αστάθεια μικροδορυφόρων⁹³. Όσον αφορά το ενδομήτριο καρκίνωμα περιλαμβάνουν ορισμένες σωματικές μεταλλάξεις των CTNNB1, PI3KCA, PPP2R1A, PTEN και ARID1A⁹⁴. Είναι ο υπότυπος ο οποίος συσχετίζεται με την ενδομητρίωση και συνδέεται με μεταλλάξεις στα PTEN, ARID1A και PIK3CA⁹⁰.

1.5.6 MUCINUS ADENOCARCINOMA: ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Το βλεννογόνο αδενοκαρκίνωμα που στο παρελθόν ονομαζόταν καρκινώματα εντερικού τύπου, είναι σπάνιο, αντιπροσωπεύοντας μόνο το 2-3% των καρκινωμάτων των ωοθηκών. Οι ασθενείς διαγιγνώσκονται συνήθως σε πρώιμο στάδιο και παρουσιάζεται σε νεότερους ασθενείς με εξαιρετική πρόγνωση μετά τη χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, τα υποτροπιάζοντα ή μεταστατικά του βλεννογόνου αδενοκαρκινώματος έχουν κακή πρόγνωση⁹⁵. Είναι μονόπλευροι, μεγάλοι, πολυκυστικοί όγκοι, γεμάτοι με βλέννα και συχνά περιέχουν στερεές περιοχές. Μορφολογικά, αποτελούνται από κύστες και αδένες διαφόρων μεγεθών με συρρικνωμένο μοτίβο και αμφιβληστροειδείς αδένες. Τα κύτταρα έχουν ένα μεγάλο κυτταρόπλασμα που περιέχει βλέννα. Το βλεννογόνο αδενοκαρκινώματα φαίνεται να προκύπτουν από τα οριακά νεοπλάσματα του βλεννογόνου και να φέρουν ένα ετερογενές πρότυπο με συνυπάρχουσες περιοχές βλεννογόνου, ορώδους καρκινώματος και αδενοκαρκινώματος. Οι πιο συνηθισμένες μοριακές μεταβολές είναι οι μεταλλάξεις KRAS, οι οποίες εμφανίζονται σε 75% του αρχικού τύπου του υπότυπου. Αυτά έχουν εντοπιστεί σε καλοήγη και σε οριακές περιοχές καθώς και σε γειτονικά καρκινώματα, υποστηρίζοντας τη διαδικασία διαδοχικής ογκογένεσης που πηγαίνει από κακοήγη βλεννογόνο βλάβη χαμηλού βαθμού σε βλεννογόνο αδενοκαρκίνωμα⁹⁶. Αυτός ο σπάνιος τύπος καρκίνου συνδέεται επίσης με μεταλλάξεις

όπως το KRAS, TP53, BRAF, CDKN2A, RNF43, ELF3, GNAS, ERBB3 και KLF5⁹⁷. Το βλεννογόνο αδενοκαρκίνωμα τείνει να είναι ανθεκτικός υπότυπος στη χημειοθεραπεία¹.

Στο παρακάτω γράφημα, παρατηρούνται οι πέντε βασικοί υπότυποι του καρκίνου των ωοθηκών ανά ποσοστά, σύμφωνα με τους Part et al. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, ο υπότυπος HGSC αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό διάγνωσης για καρκίνο των ωοθηκών που ξεπερνάει το 70%. Ακολουθούν το ενδομήτριο καρκίνωμα και τα διαυγή καρκινικά κύτταρα με περίπου 10% διάγνωση και πιο χαμηλά ποσοστά ανήκουν στο LGSC υπότυπο και το βλεννογόνο αδενοκαρκίνωμα⁹⁸.



Εικόνα 9: Με βάση την ιστοπαθολογία και τις μοριακές γενετικές μεταβολές, τα καρκινώματα των ωοθηκών χωρίζονται σε πέντε βασικούς τύπους:

HGSC ~72%, ενδομήτριο καρκίνωμα:10%, clear-cell:10%, mucinous: 3% και το LGSC <5%. που αντιπροσωπεύουν πάνω από το 95% των περιπτώσεων ⁹⁸.

1.6 Υποτροπιάζον καρκίνος των ωοθηκών (ROC: recurrent ovarian cancer)

Παρά τη βέλτιστη χειρουργική επέμβαση και την κατάλληλη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής, το 70 -80% των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών θα εμφανίσει υποτροπή της νόσου⁹⁹. Το 80% των ασθενών με προχωρημένη νόσο εμφανίζουν επανεμφάνιση εντός 5 ετών από τη διάγνωση¹⁰⁰ με το 70% αυτών να υποτροπιάζουν εντός 18 μηνών¹⁰¹. Συνεπώς, υπάρχει επείγουσα ανάγκη βελτίωσης των αποτελεσμάτων για ασθενείς με υποτροπιάζοντα και ανθεκτικό καρκίνο των ωοθηκών¹⁰² για ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μέσων που στοχεύουν σε χημειοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα.

Τον Νοέμβριο του 2015, η Γυναικολογική Διαγνωστική Ομάδα (Gynecologic Cancer Intergroup) επαναπροσδιόρισε τη συμβατική πρακτική της χρήσης του διαστήματος χωρίς πλατίνα για να κατηγοριοποιήσει τους ασθενείς ως ανθεκτικούς στην πλατίνα ή για την ανθεκτικότητα στην πλατίνα και αντικατέστησε αυτή την πρακτική με ένα διάστημα χωρίς θεραπεία με την αποκοπή σε 6 μήνες. Κατά τη στιγμή της υποτροπής, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο δευτερογενούς χειρουργικής επέμβαση (SDS: secondary debulking surgery) για τους κατάλληλους ασθενείς¹⁰³. Δεδομένου ότι ο ελεύθερος χρόνος διαστήματος από την τελευταία χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα μέχρι την επανεμφάνιση (PFI: platinum free interval) είναι ένας καλός δείκτης για τη δευτερογενή ανταπόκριση στην επανεπεξεργασία, η επακόλουθη θεραπεία είναι σταθερή σε αυτό. Σύμφωνα με την 4η συνάντηση της GCIG για τον Καρκίνο των Ωοθηκών το 2011¹⁰¹, ο επαναλαμβανόμενος καρκίνος των ωοθηκών ταξινομήθηκε ιστορικά ως εξής¹⁰⁴:

- Ανθεκτική νόσος (RD): πρόοδος της νόσου κατά την τελευταία γραμμή θεραπείας με πλατίνα ή εντός 4 εβδομάδων από την τελευταία δόση πλατίνας
- Ασθένεια ανθεκτική σε πλατίνα (PR): PFI > 1 και <6 μήνες
- Μερική ευαισθησία στην πλατίνα (PPS): PFI 6 - 12 μήνες
- Ευαίσθητη σε πλατίνα ασθένεια (PS): PFI > 12 μήνες

Τα δεδομένα από την προοπτική AGO-DESKTOP III καταδεικνύουν ότι η χειρουργική επέμβαση για ROC φαίνεται να είναι επωφελής για επιλεγμένους ασθενείς με υποτροπή και ευαισθησία στην πλατίνα που υποβάλλονται σε πλήρη εκτομή. Σε σχέση με τη συστηματική θεραπεία, τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την επιλογή της θεραπείας σε ROC θεωρούνται η ιστολογία του όγκου, το διάστημα χωρίς πλατίνα (PFI) και η προηγούμενη θεραπεία με bevacizumab (αντι-VEGF μονοκλωνικό αντίσωμα)⁹⁹.

Πολλοί ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών είναι ασυμπτωματικοί κατά τη στιγμή της υποτροπής τους και ως εκ τούτου ο επαναλαμβανόμενος καρκίνος των ωοθηκών ανιχνεύεται συχνότερα από αυξημένα επίπεδα CA-125. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση αυτής της δοκιμής για την ανίχνευση υποτροπών κυμαίνεται από το 60% έως 94% και από το 91% έως 100%, αντίστοιχα^{54,105}.

1.6.1 Ευαίσθητη στην πλατίνα ασθένεια

Ασθενείς σε διάστημα 6 έως 12 μηνών χωρίς πλατίνα έχουν μερική ευαισθησία σε αυτή, ενώ σε όσους έχουν αυξημένη ευαισθησία, η υποτροπή εμφανίζεται 12 μήνες μετά από τη χημειοθεραπεία^{106,107}.

Η παρουσία σωματικών μεταλλάξεων BRCA επιτρέπει στους ασθενείς που ανταποκρίνονται στην πλατίνα να βελτιστοποιούν την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας και να παρατείνουν το PFS με τη χρήση του olaparib (αναστολέα PARP) που χορηγείται ως θεραπεία συντήρησης μέχρι την εξέλιξη. Σε ασθενείς που δεν είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία με bevacizumab στην πρώτη γραμμή, ο συνδυασμός carboplatin / gemcitabine / bevacizumab¹ που ακολουθείται από συντήρηση, αποτελεί βιώσιμη εναλλακτική λύση σε ευαίσθητους στην πλατίνα ασθενείς (PFI > 6 μήνες)⁹⁹.

Στις περιπτώσεις ευαισθησίας σε πλατίνα εάν δεν υποδεικνύεται χειρουργική επέμβαση, χρησιμοποιείται χημειοθεραπεία με πλατίνα με έξι έως οκτώ κύκλους θεραπείας^{108,109,110}. Έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές συντήρησης για την καθυστέρηση της εξέλιξης της υποτροπής και ενδεχομένως τη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης¹¹¹.

1.6.2 Ασθένεια ανθεκτική στην πλατίνα

Ασθενείς με διάστημα μικρότερο των 6 μηνών χωρίς πλατίνα έχουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία με πλατίνα^{106,107}.

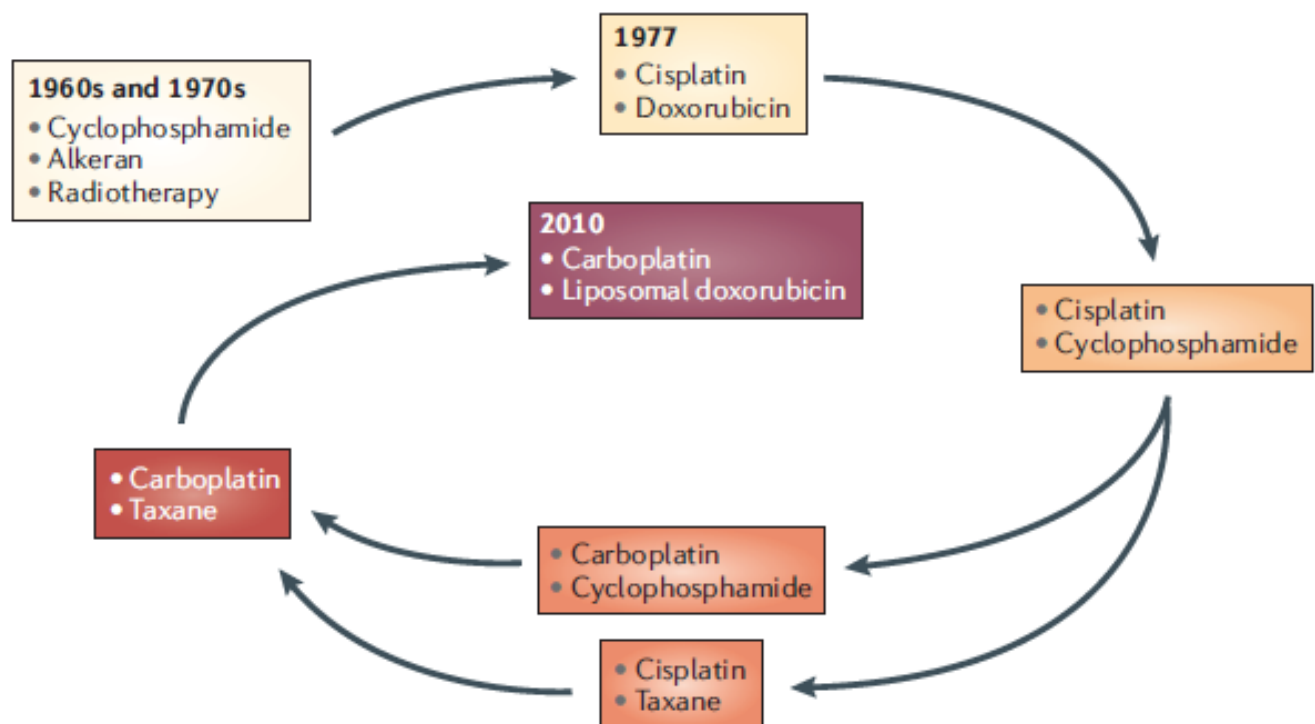
Σε ασθενείς με ανθεκτικότητα στην πλατίνα (PFI <6 μήνες), ενδείκνυται η μονοθεραπεία με φάρμακο χωρίς πλατίνα ή η συμμετοχή σε κλινικές δοκιμές. Η συσχέτιση μονοθεραπείας χωρίς πλατίνα με bevacizumab, ακολουθούμενη από συντήρηση, έχει εγκριθεί σε αυτό το πλαίσιο σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες λόγω του οφέλους της PFS)⁹⁹. Συγκεκριμένα, χορηγείται bevacizumab με εβδομαδιαία χρήση paclitaxel, pegylated liposomal doxorubicin ή topotecan treatment ως πρώτη γραμμή θεραπείας, η οποία εγκρίθηκε τόσο από τον FDA (Food and Drug Administration) όσο και από την EMA (European Medicines Agency), σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης AURELIA.

Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε η αύξηση του PFS και του ποσοστού ανταπόκρισης με το bevacizumab αλλά και το ότι το paclitaxel plus bevacizumab ήταν ο καλύτερος συνδυασμός με αυξημένο ρυθμό ανταπόκρισης, PFS και συνολική επιληπτικότητα^{112,113}.

1.7 Θεραπείες - Διαθέσιμες για καρκίνο των ωοθηκών

Ο βασικός άξονας της θεραπείας του καρκίνου των ωοθηκών είναι ένας συνδυασμός χειρουργικής επέμβασης και χημειοθεραπείας, όπου η χημειοθεραπεία βασίζεται συνήθως στην πλατίνα¹¹⁴. Δυστυχώς, πολλά από τα φάρμακα που ερευνώνται έχουν βρεθεί να είναι ανενεργά ή να έχουν απογοητευτικά κλινικά αποτελέσματα¹¹⁵.

Η χημειοθεραπεία συνήθως γίνεται μετά την αρχική χειρουργική επέμβαση. Η χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής συνήθως περιέχει πλατίνα που είναι πρότυπο θεραπείας τα τελευταία χρόνια με χρήση της παγκοσμίως¹⁰⁰.



Εικόνα 10: Η εξέλιξη της χημειοθεραπείας για καρκίνο των ωοθηκών τα τελευταία 50 χρόνια¹¹⁴

Δυστυχώς, έχει αποδειχθεί ότι είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί νέα θεραπεία πέρα από τη θεραπεία με βάση την πλατίνα, η οποία εισήχθη στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και παραμένει μέχρι σήμερα πρότυπο της θεραπείας. Για τον καρκίνο των ωοθηκών έχουν χρησιμοποιηθεί θεραπεία με πλατίνα και στη συνέχεια η καρβοπλατίνη, η οποία έχει χαμηλότερη τοξικότητα. Οι δυο αυτές ουσίες έχουν συνδυαστεί και με άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ταξανίων¹¹⁴. Ωστόσο, παρά τις σημαντικές εξελίξεις στην αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας στις αρχές του 2000, η καμπύλη επιβίωσης δεν

έχει αλλάξει σημαντικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι χρειάζονται άμεσα εναλλακτικές προσεγγίσεις⁷⁰. Πιο πρόσφατα, η λιποσωμική δοξορουβικίνη έχει συνηθισθεί να χρησιμοποιείται με την καρβοπλατίνη, ειδικά στην κατάσταση υποτροπής. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο συνδυασμός της καρβοπλατίνης και της λιποσωματικής δοξορουβικίνης περιλαμβάνει παρόμοια φάρμακα με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1970, αν και με μειωμένες παρενέργειες. Είναι πιθανό ότι η θεραπεία για τον καρκίνο των ωοθηκών θα εξελιχθεί σημαντικά τα επόμενα χρόνια με την εισαγωγή μοριακών στοχευμένων παραγόντων, όπως αναστολείς PARP ¹¹⁴.

Οι αναστολείς PARP (Inhibitors Poly ADP Ribose Polymerase) έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς σε υποτροπιάζοντα υπότυπο HGSC λόγω μεταλλάξεων σε BRCA1, BRCA2 ή με λειτουργική αδρανοποίηση μέσω μεθυλίωσης⁷³. Οι αναστολείς έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη δραστηριότητα ως μονοθεραπεία σε γυναίκες με υποτροπιάζουσα νόσο ανεξάρτητα από τις μεταλλάξεις BRCA1 και BRCA2 και με βελτιωμένη δραστηριότητα σε γυναίκες με μεταλλάξεις BRCA1 ή BRCA2 και ευαισθησία στην πλατίνα ^{116,117,118}.

Το Olaparib (AZD2281) είναι αναστολέας PARP, ο οποίος χορηγείται από το στόμα και έχει δείξει αντικαρκινική δράση σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών υπότυπου HGSC με ή χωρίς μεταλλάξεις BRCA1 ή BRCA2 ^{117,119}. Το Olaparib ήταν ο πρώτος αναστολέας PARP που εγκρίθηκε αρχικά για τη θεραπεία του προχωρημένου EOC σε ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις BRCA1 ή BRCA2 που έλαβαν τρεις ή περισσότερους κύκλους χημειοθεραπείας με ποσοστό ανταπόκρισης 31,1% ^{117,120}. Χρησιμοποιήθηκε ως θεραπεία συντήρησης, το οποίο βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση χωρίς εξέλιξη μεταξύ ασθενών με ευαισθησία στην πλατίνα, σε κατάσταση υποτροπής και σε HGSC ασθενείς ¹¹⁹. Το Olaparib εγκρίθηκε στην Ευρώπη ως θεραπεία διατήρησης σε ασθενείς με HGSOC και με ευαισθησία στην πλατίνα που χαρακτηρίζονται από μετάλλαξη BRCA1 ή BRCA2 ¹¹⁹.

Τον Δεκέμβριο του 2016, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) χορήγησε επιταχυμένη έγκριση του Rucaparib για τη θεραπεία ασθενών με HGSC που φέρουν επιβλαβείς γενετικές ή σωματικές μεταλλάξεις BRCA1 ή BRCA2 και που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία με δύο ή περισσότερες σειρές χημειοθεραπείας¹¹⁸.

1.7.1 Μηχανισμοί:

Συνήθως κύριος στόχος των φαρμάκων με βάση την πλατίνα είναι το DNA, έτσι λοιπόν η ευαισθησία και η αντοχή του κάθε οργανισμού σε αυτά τα φάρμακα επηρεάζονται και εξαρτώνται από την ικανότητα των κυττάρων να αναγνωρίζουν και να επιδιορθώνουν τις βλάβες που προκλήθηκαν στο DNA¹²¹. Περίπου το 50% των επιθηλιακών καρκίνων των ωοθηκών εμφανίζουν ελαττωματική επιδιόρθωση DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HR: Homologous Recombination) λόγω γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων των γονιδίων της οδού HR, όπως είναι για παράδειγμα τα γονίδια BRCA1 και BRCA2⁷⁰.

Θεραπείες που περιέχουν φάρμακα με βάση την πλατίνα, αντιπροσωπεύουν τη θεραπεία «πρώτης γραμμής» για τον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Ο μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αυτών με βάση την πλατίνα, περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση τους με το DNA και τον σχηματισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Οι αλλοιώσεις του DNA ενεργοποιεί μια απόκριση βλάβης του DNA με την ενεργοποίηση των κυτταρικών οδών που οδηγούν σε επιβράδυνση ή ακόμη και αναστολή της σύνθεσης του DNA και του κυτταρικού κύκλου. Οι βλάβες αυτές έχουν καθοριστικό ρόλο για τη διατήρηση του DNA, ενώ η γονιδιωματική αστάθεια αναφέρεται ως χαρακτηριστικό για τον καρκίνο. Οι βλάβες αυτές επιδιορθώνονται ως αυθόρμητη αντίδραση του οργανισμού⁷⁰.

Οι καλύτερα μελετημένες γενετικές μεταβολές όσον αφορά στον καρκίνο των ωοθηκών είναι όσες εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA. Γενετικές ή σωματικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε γονίδια του ομόλογου ανασυνδυασμού κι έχουν ταυτοποιηθεί για περίπου το 1 / 3 των περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών. Τα γονίδια αυτά που σχετίζονται με τον ομόλογο ανασυνδυασμό είναι τα BRCA1, BRCA2, BRIP1, RAD51, PALB2, BARD1, MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 ⁷⁰.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ:

Ο καρκίνος των ωοθηκών, βάσει στατιστικών δεδομένων είναι ένας από τους πιο συχνούς καρκίνους και μια από τις κύριες αιτίες θανάτου (από καρκίνο) στις γυναίκες παγκοσμίως. Ο καρκίνος των ωοθηκών μπορεί να χαρακτηριστεί κι ως ένας σιωπηλός καρκίνος μιας και η έγκαιρη διάγνωση του είναι δύσκολη αφού δεν υπάρχουν συγκεκριμένα συμπτώματα και ενδείξεις σε πρώιμο στάδιο αλλά σ' ένα μεταγενέστερο στάδιο. Η θεραπεία που χρησιμοποιείται είναι τα κλασσικά χημειοθεραπευτικά (πλατίνα, ταξόλη) χωρίς να χρησιμοποιούνται πιο ειδικά και στοχευμένα φάρμακα.

Έτσι λοιπόν, είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων καλύτερων από αυτά που υπάρχουν ή με καλύτερη συνέργεια με αυτά που υπάρχουν ήδη.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, κύριος στόχος είναι η μελέτη της βιολογικής δράση μιας νέας χημικής ένωσης ως χημικοθεραπευτικό φάρμακο για τον καρκίνο των ωοθηκών. Η εργασία αυτή βασίζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όπου με την καλλιέργεια τους μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα της ένωσης αυτής αλλά και η συνέργεια με άλλα χημικοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία ήδη. Επιπρόσθετα, γίνεται προσπάθεια για να βρεθεί κατά πόσο η νέα αυτή ένωση επιδρά στο DNA: κατά πιο τρόπο και πως συνδέεται στο DNA και πως προκαλεί καταστολή του πολλαπλασιασμού του κυτταρικού κύκλου. Σκοπός είναι να καταστεί κατανοητό αν η ένωση είναι καλό φάρμακο και αν αναστρέφει την ανθεκτικότητα της πλατίνης.

Απαιτούνται νέες προσεγγίσεις για τον εντοπισμό νέων θεραπευτικών στόχων, ιδιαίτερα στον καρκίνο των ωοθηκών υψηλού βαθμού ορώδους καρκινώματος. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επικύρωση της προγνωστικής σημασίας άλλων ενισχυμένων γονιδίων σε καρκίνους ωοθηκών υψηλού βαθμού και για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων που τους στοχεύουν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Υλικά και μέθοδοι

3.1.1 Αντισώματα και αντιδραστήρια:

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν πρωτοταγή αντισώματα, δευτεροταγή αντισώματα, η πλατίνα, η οποία στη διπλωματική εργασία αναφέρεται ως φάρμακο cisplatin [Cisplatin/Hospira (Hospira UK Ltd)], και η χημική ένωση η οποία έχει ονομαστεί «compound 127». Η ένωση αυτή έχει συντεθεί στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στον τομέα της Οργανικής Χημείας.

Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: αντίσωμα κουνελιού Phospho-Histone H2A.X: Ser139 (20E3) της εταιρείας Cell Signaling Technology, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ανοσοφθορισμού. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα ποντικού p53 (DO-7): sc-47698 (Santa Cruz Biotechnology), τόσο για πειράματα ανοσοαποτύπωσης όσο και για ανοσοφθορισμό. Επιπλέον, μόνο για τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κουνελιού Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) της εταιρείας Cell Signaling Technology. Τέλος, τα αντισώματα του ποντικού anti-actin, clone C4 (EMD Millipore) και anti-GAPDH (Sigma-Aldrich) χρησιμοποιήθηκαν και αυτά για τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

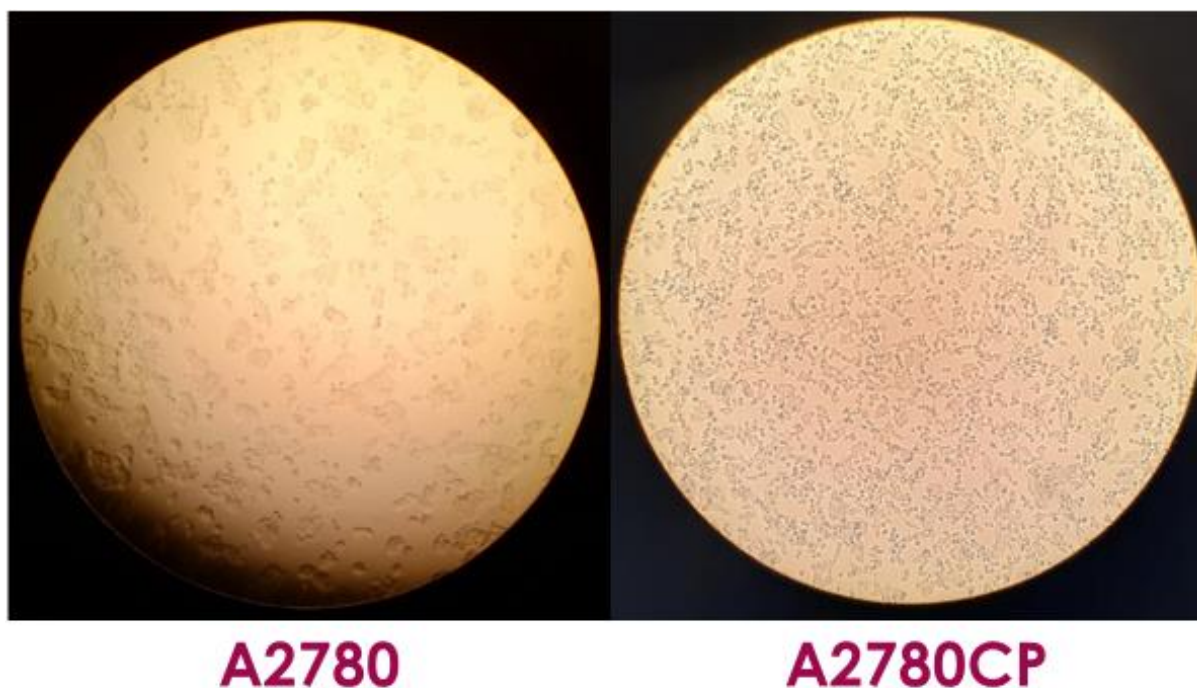
Τα δευτεροταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ανοσοαποτύπωσης (western blot) με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL, Clarity[™] Western ECL Substrate) στα οποία το αντίσωμα IgG είναι συνδεδεμένο με HRP (horseradish peroxidase) είναι: Το αντίσωμα Ig-G συνδεδεμένο με HRP αντίσωμα ποντικού και κουνελιού (Cell Signaling). Όσον αφορά τα πειράματα ανοσοφθορισμού, τα δευτεροταγή αντισώματα είναι συζευγμένα με αντίσωμα ποντικού 488 και κουνελιού 594 (ALEXA FLUOR) καθώς και το αντιδραστήριο ProLong[™] Gold Antifade Mountant με DAPI της εταιρείας Thermo Fisher Scientific.

3.1.2 Κυτταροκαλλιέργεια:

Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (BioSera) με χαμηλή περιεκτικότητα γλουταμίνης και 25 mM HEPES, όπου προστέθηκε 10% (v/v) εμβρυικός βοειδής ορός (FBS: Fetal Bovine Serum) και αντιβιοτικά πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ειδικό επωαστή στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας είναι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές ωοθηκών:

- A2780 είναι ανθρώπινη καρκινική σειρά ωοθηκών
- A2780CP είναι ανθρώπινη καρκινική σειρά ωοθηκών ανθεκτική στην πλατίνη

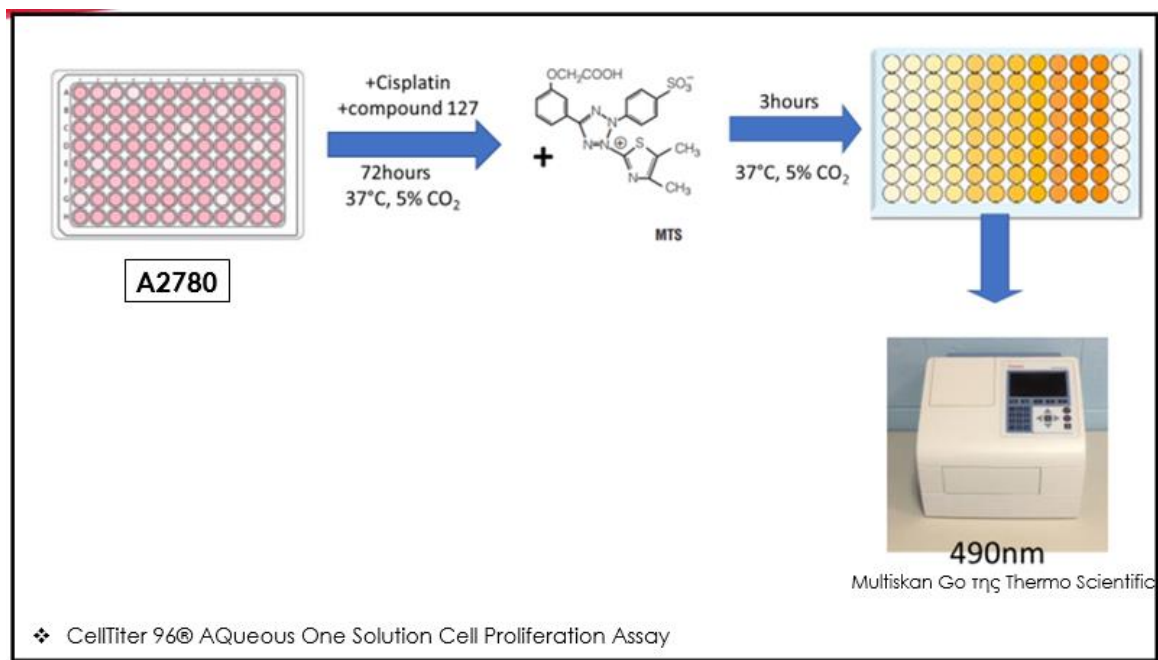


Εικόνα 11: Φωτογραφική απεικόνιση των κυτταρικών σειρών A2780 (αριστερά) και A2780CP (δεξιά) από μικροσκόπιο.

3.1.3 Τεχνική MTT (MTT assay)

Για τη τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε το «The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay», το οποίο είναι μια χρωματομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε αναλύσεις πολλαπλασιασμού ή κυτταροτοξικότητας. Το αντιδραστήριο του «The CellTiter 96® AQueous One Solution» περιέχει μια νέα ένωση τετραζολίου [3 - (4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο) - 5 - (3 - καρβοξυμεθοξυφαινυλο) - 2 - (4 - σουλφοφαινυλο) - 2H-τετραζολίου, **MTS**] και ένα αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων (αιθοθειική φαιναζίνη, PES). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των βιώσιμων κυττάρων να μετατρέπουν τα άλατα του τετραζολίου (MTS) σε μη διαλυτά παράγωγα της φορμαζάνης.

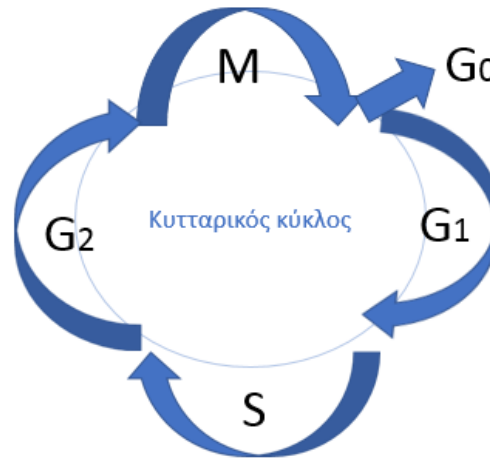
Για τη τεχνική MTT (Σχήμα 1), τα κύτταρα A2780 αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένη πλάκα 96 πηγαδιών και εκτέθηκαν στα φάρμακα cisplatin και «compound 127» για 72 ώρες στον ειδικό επωαστή στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των φαρμάκων / ουσιών οι οποίες κυμαίνονταν από 0 έως 1 μM (0, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 μM) για τη «compound 127», ενώ από 0 μέχρι 10 μM για το cisplatin (0, 1, 5, 10 μM). Μετά τις 72 ώρες έκθεσης, στα πηγάδια προστίθενται 30 μl από το διάλυμα «CellTiter 96® AQueous One Solution» και αφήνονται στον ειδικό επωαστή για περίπου 3 ώρες. Στο τέλος της περιόδου επώασης, με τη βοήθεια του μηχανήματος «Multiskan Go» της Thermo Scientific καταγράφεται η απορρόφηση στα 490nm. Η ποσότητα προϊόντος φορμαζάνης είναι ευθέως ανάλογη προς τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων της καλλιέργειας.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής MTT. Έπειτα από 72 ώρες έκθεσης, γίνεται η προσθήκη του MTS αντιδραστηρίου για 3 ώρες στους 37°C. Τέλος, γίνεται η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 490nm.

3.1.4 Κυτταρικός Κύκλος (Cell Cycle):

Η ανάλυση κυτταρικού κύκλου με ποσοτικοποίηση του περιεχομένου του DNA ήταν μία από τις πρώτες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής.



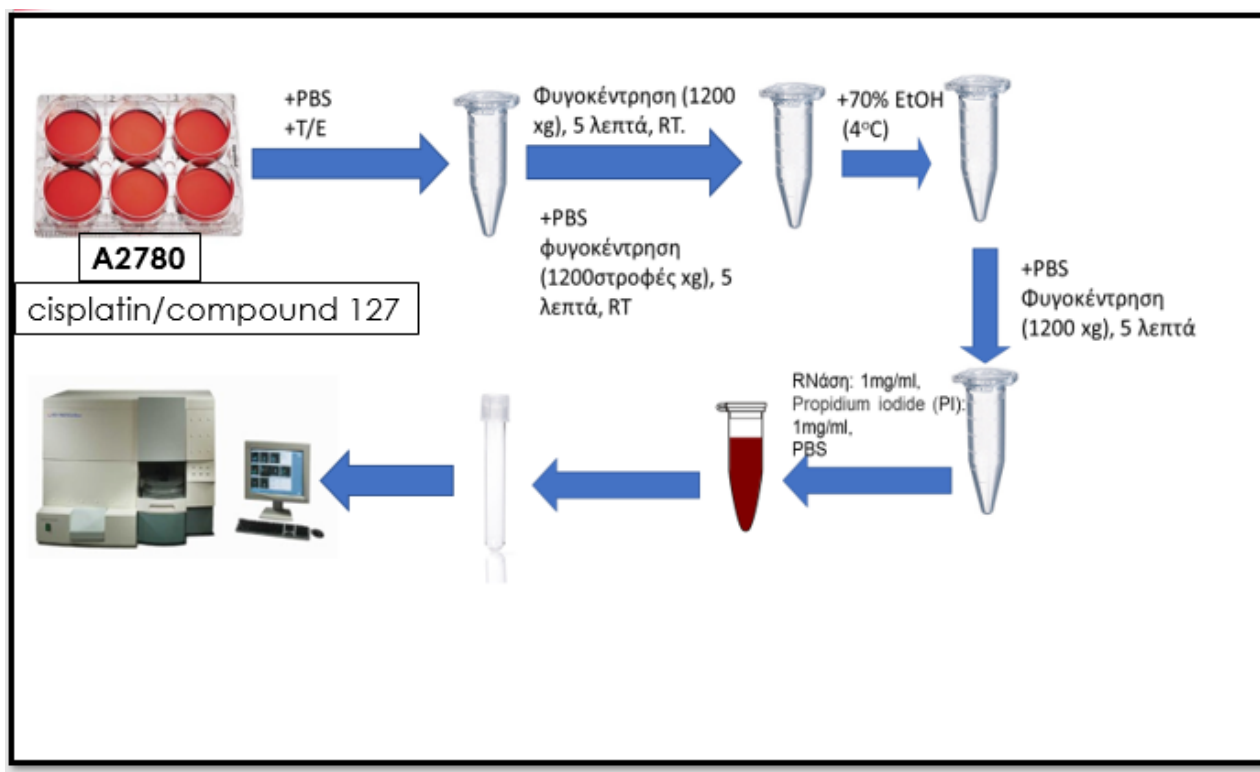
Σχήμα 2: Ο κυτταρικός κύκλος (cell cycle) είναι μια πολύ καλή διεργασία με κύριο αποτέλεσμα τη διαίρεση του κυττάρου, όπου περιλαμβάνει τη μεσόφαση και τη μίτωση. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνονται:

- Φάση G_1 , το διάστημα όπου το κύτταρο βρίσκεται στη φάση ανάπτυξης, μαζεύει υλικά για να αναπτυχθεί.
- Φάση S , η σύνθεση και ο διπλασιασμός του DNA.
- Φάση G_2 , η δεύτερη ανάπτυξη του κυττάρου.
- Φάση M , η περίοδος της κυτταρικής διαίρεσης.

Συγκεκριμένα, το DNA των κυττάρων μπορεί να χρωματιστεί με μια ποικιλία βαφών σύνδεσης DNA. Οι χρωστικές ουσίες προϋποθέτουν να είναι στοιχειομετρικά ίσες και να δεσμεύονται ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υπάρχει στο κύτταρο¹²².

Αφού τα κύτταρα (A2780) πλυθούν με PBS και θρυψινοποιούνται, μεταφέρονται σε Eppendorf-tubes και φυγοκεντρούνται στις 1.200 στροφές για μόλις πέντε λεπτά (5 min), σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και τα κύτταρα πλένονται ξανά με PBS και γίνεται ξανά φυγοκέντρωση στις 1.200 στροφές για 5 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται ξανά κι αυτή τη φορά προστίθενται 500μl από κρύα αιθανόλη 70% (στάγδην – στάγδην) και ανακινούνται ισχυρά. Τα κύτταρα αφήνονται στους 4°C για περίπου 30 min και συνεχίζονται οι εκπλύσεις με PBS και έπειτα γίνονται φυγοκεντρήσεις

στις 1.200 στροφές για 5 min (2 επαναλήψεις). Έπειτα, προστίθενται 200 μl από το master mix (RNάση: 1mg/ml, Propidium iodide (PI): 1mg/ml, PBS). Τέλος, οι ποσότητες μεταφέρονται σε ειδικά Fac's tubes, όπου προστίθεται PBS μέχρι τα 500μl. Η διαδικασία έγινε με τη χρήση του μηχανήματος BD FACSCalibur και τη βοήθεια του Δρ. Γιώργου Τρίγκα (Σχήμα 3).



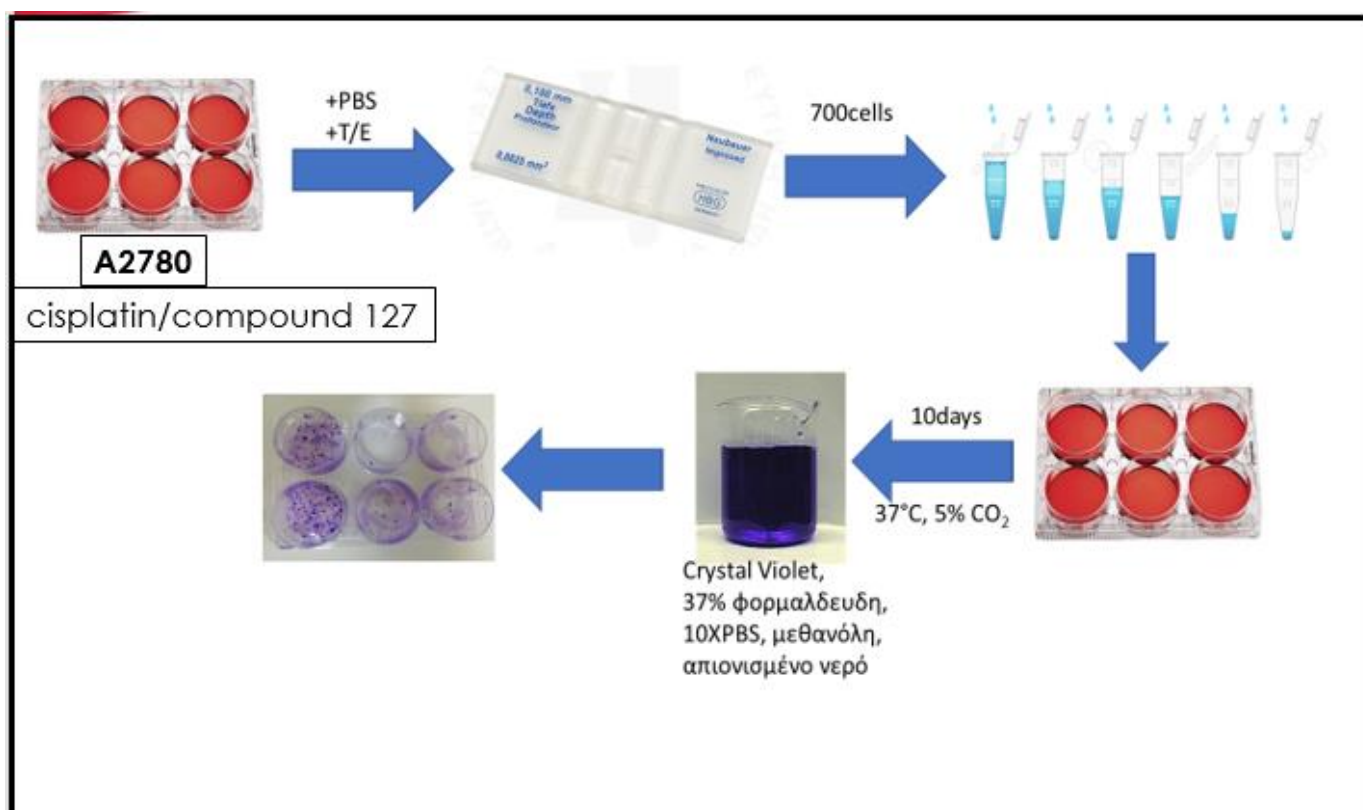
Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας προσδιορισμού του κυτταρικού κύκλου με τη χρήση PI και κυτταρομετρίας ροής.

3.1.5 Clonogenic assay or colony formation assay

Η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών είναι ένας προσδιορισμός *in vitro* κυτταρικής επιβίωσης με βάση την ικανότητα ενός μόνο κυττάρου να αναπτυχθεί σε μια αποικία. Η αποικία ορίζεται ότι αποτελείται τουλάχιστον από 50 κύτταρα. Η δοκιμασία αυτή είναι η μέθοδος επιλογής για τον προσδιορισμό θανάτου του αναπαραγωγικού κυττάρου μετά από θεραπεία με ιονίζουσα ακτινοβολία, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας άλλων κυτταροτοξικών παραγόντων, όπως είναι για παράδειγμα η προσθήκη των φαρμάκων.

Στα κύτταρα (A2780) έγινε η επίδραση φαρμάκου για 8 ώρες και στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και έγινε θρυψινοποίηση σε αυτά και μέτρηση των κυττάρων

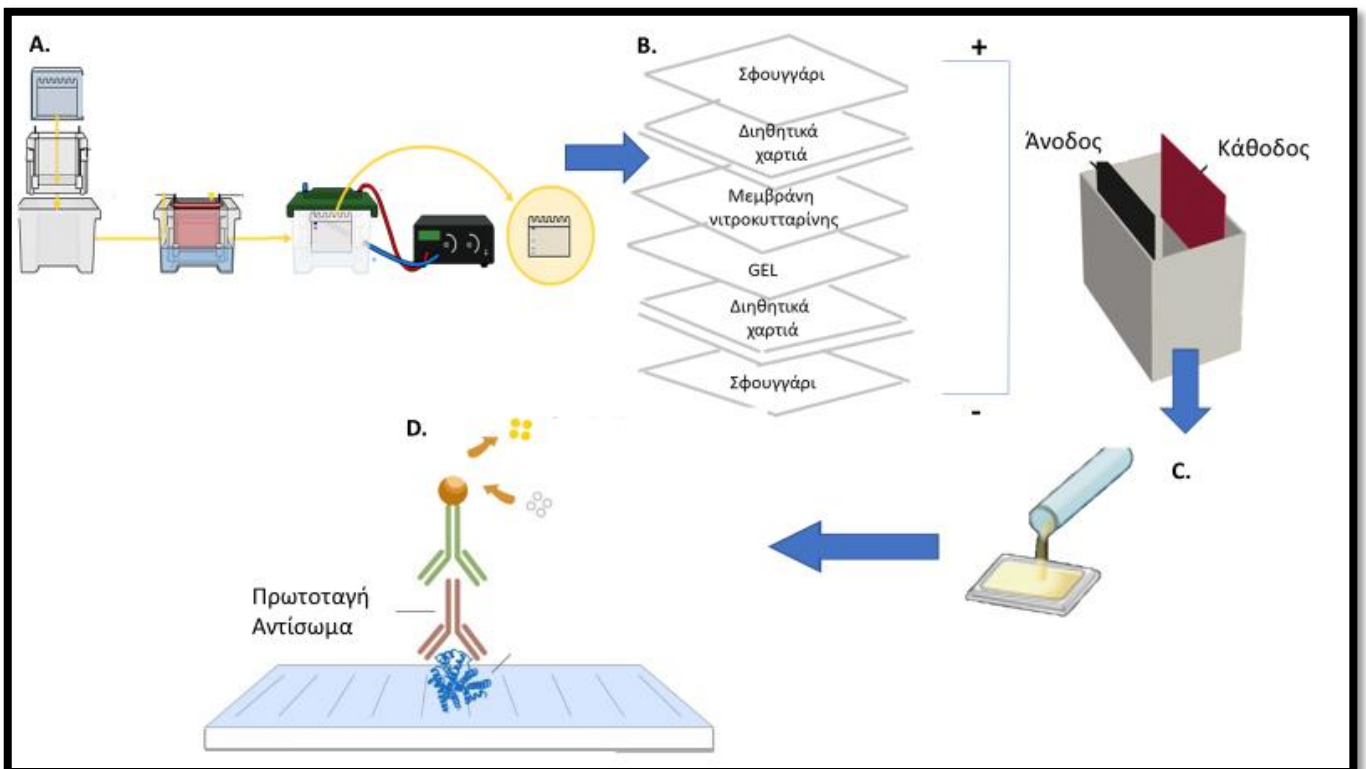
σε πλάκα Neubauer, όπως φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση στο *σχήμα 4*. Τα κύτταρα αυτή τη φορά στρώθηκαν σε πλάκα 6 πηγαδιών με συγκεκριμένες αραιώσεις μόνο για 700 κύτταρα ανά πηγάδι. Τα κύτταρα αυτά αφέθηκαν για 10 μέρες στον επωαστή με 5% CO₂, όπου αναπτύσσονται οι αποικίες. Από τα κύτταρα απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε διάλυμα μονιμοποίησης και χρώσης (0.5 g Crystal Violet, 27 ml 37% φορμαλδεΰδη, 100 ml 10XPBS, 10 ml μεθανόλη, απιονισμένο νερό). Το διάλυμα παραμένει για 20 λεπτά στην πλάκα πηγαδιών, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται και η πλάκα πηγαδιών πλένεται καλά με απιονισμένο νερό. Τα κύτταρα αφέθηκαν να στεγνώσουν καλά και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν.



Σχήμα 4: Πειραματική διαδικασία της τεχνικής colony formation. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει 10 – 14 μέρες, ανάλογα με την ανάπτυξη των αποικιών. Στη διαδικασία αυτή περιλαμβάνεται στρώσιμο κυττάρων A2780 και προσθήκη των συγκεκριμένων φαρμάκων για 8 ώρες. 700 κύτταρα ανά πηγάδι (αποστειρωμένη πλάκα 6 πηγαδιών) όπου καλλιεργούνται για 10 μέρες μέχρι να αναπτυχθούν οι αποικίες. Τέλος, γίνεται μονιμοποίηση των κυττάρων με 37% φορμαλδεΰη και χρώση με το crystal violet.

3.1.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blot):

Η ανοσοαποτύπωση Western είναι μια σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Η τεχνική αυτή βοηθά στην αναγνώριση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα πολύπλοκο μίγμα πρωτεϊνών που εξάγονται από τα κύτταρα. Η τεχνική (σχήμα 5) περιλαμβάνει τρία στάδια: (Α) διαχωρισμό κατά μέγεθος, (Β-Γ) μεταφορά σε ένα στερεό υπόστρωμα, τη μεμβράνη και (Δ) σήμανση της πρωτεΐνης στόχου χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα για την απεικόνιση. Η εμφάνιση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος γίνεται με τη χρήση ενζυμικών ιχνηθετών και συγκεκριμένα του αντιδραστηρίου ECL (Enhanced ChemioLuminescence Substrate), η οποία βασίζεται στη χημειοφωταύγεια ¹²³.



Σχήμα 5: Πειραματική διαδικασία ανοσοαποτυπωσης πρωτεϊνών κατά western σε τρία στάδια :

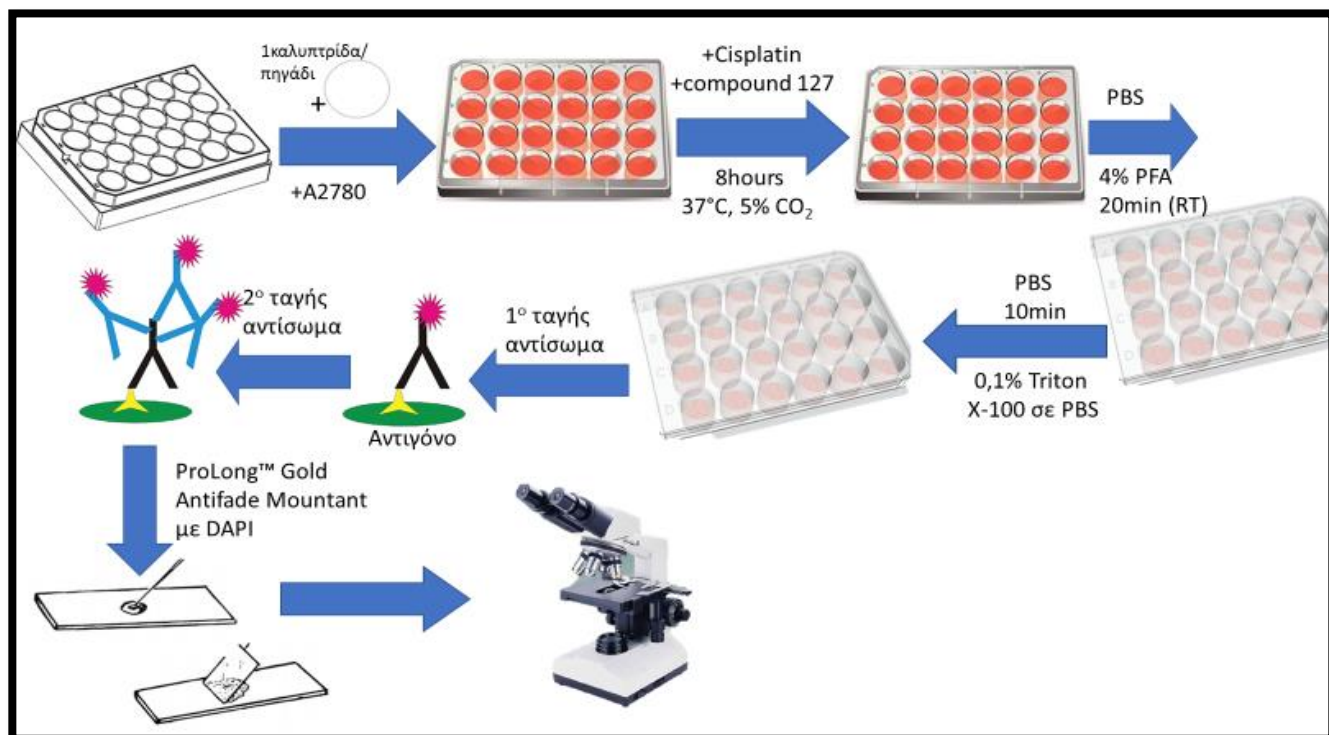
(Α) διαχωρισμό κατά μέγεθος, (Β-Γ) μεταφορά σε ένα στερεό υπόστρωμα, τη μεμβράνη και (Δ) σήμανση της πρωτεΐνης στόχου με κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα για την απεικόνιση.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, τα κύτταρα (κυτταρική σειρά: A2780) αφού εκτέθηκαν για οκτώ (8) ώρες στα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν (cisplatin και compound 127), λύθηκαν με διάλυμα λύσης RIPA εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών. Η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων προσδιορίστηκε ποσοτικά με τη χρήση του PierceTM BSA Protein Assay Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του.

Για την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα παρασκευάστηκαν με ανάμιξη 3X SDS Loading Buffer (150m M Tris HCl, p H: 6,8, 6% SDS, 30% γλυκερόλη, 9% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,3% μπλέ της βρωμοθυμόλης) με 10 - 30μg από τα εκχυλίσματα πρωτεϊνών. Έτσι, ίσες ποσότητες πρωτεϊνών φορτώθηκαν σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 10 ή 12 ή 15%. Διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE [120V, δυο ώρες και τριάντα λεπτά (2h30min)] και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης. Όσον αφορά τις μεμβράνες νιτροκυταρίνης, οι μη-ειδικές θέσεις πρόσδεσης καλύπτονται (με blocking buffer) με επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα το οποίο περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη που περιέχει 1% BSA (Albumin Fraction V, p H: 7.0) για μια ώρα και στη συνέχεια επωάστηκαν με το αντίστοιχο πρωτοταγές αντίσωμα, σε ήπια ανάδευση για όλη τη νύχτα στους 4°C. Αφού ξεπλυθεί καλά η μεμβράνη (3 πλύσεις ανά 10 λεπτά) ώστε να απομακρυνθεί το μη-προσδεμένο αντίσωμα και να διασπαστούν οι ασθενείς μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος με διάλυμα 1X TBS-T (TBS και Tween20), η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα (σε ήπια ανάδευση για 1 ώρα). Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει αντίστοιχο πρωτογενές, και συγκεκριμένα τη σταθερή περιοχή του, η οποία είναι χαρακτηριστική και ειδική του ζώου (ποντικίου ή κουνελιού) στο οποίο παρασκευάστηκε το αντίσωμα. Συνήθως, το δευτερογενές αντίσωμα είναι διαλυμένο σε 1% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη και 0,20 % BSA και συνήθως είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με ένα ένζυμο (HRP). Έπειτα από άλλες 3 πλύσεις με TBS-T (10 min ανά πλύση) η μεμβράνη επωάζεται για 1 min με ECL και οι εντάσεις σήματος των πρωτεϊνών αναπτύχθηκαν με τη βοήθεια του συστήματος iBright1000. Τέλος, οι εντάσεις σήματος των πρωτεϊνών κανονικοποιήθηκαν έναντι ενός φορτίου ελέγχου GAPDH ή β-ακτίνης για κάθε δείγμα.

3.1.7 Ανοσοφθορισμός:

Για να αναλυθεί η επίδραση της συγκέντρωσης ουσίας «compound 127» σε σύγκριση με το cisplatin (για 8 ώρες), η καρκινική κυτταρική σειρά A2780 (75.000 κύτταρα ανά πηγάδι) σε αποστειρωμένη πλάκα 24 πηγαδιών. Οι συνθήκες καλλιέργειας και κατεργασίας κατέληξαν σε απομάκρυνση του μέσου καλλιέργειας με έκπλυση PBS και σταθεροποίηση κυττάρων με 4% παραφορμαλδεύδη (PFA) για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT: Room Temperature). Έπειτα, ακολούθησαν εκπλύσεις με PBS για 10 min η κάθε μια και στη συνέχεια έγινε προσθήκη 0,1% Triton X-100 σε PBS. Επιπλέον, έγινε επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα (1 / 500 για το 53BP1, 1 / 400 για το γ-H2AX, 1 / 100 για το p53) σε 1% BSA σε PBS στους 4°C για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με PBS για 10 min η κάθε πλύση και επώαση με τα αντίστοιχα δευτεροταγή αντισώματα σε 1% BSA σε PBS για 1 ώρα. Οι καλυπτρίδες πλύθηκαν 3 φορές με PBS (10 min ανά πλύση) και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο ProLong™ Gold Antifade Mountant με DAPI (4',6 – diamidino – 2 - phenylindole) της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Για την ανάκτηση εικόνας χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένη πλάκα 24 πηγαδιών, αποστειρωμένες καλυπτρίδες, οι ουσίες που σημειώνονται, 4% PFA (παραφορμαλδεύδη), 0,1% Triton X-100 σε PBS, πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα ειδικά για τον ανοσοφθορισμό, ProLong Gold Antifade Mountant με DAPI, αντικειμενοφόρους πλάκες και μικροσκόπιο φθορισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως προαναφέρθηκε πιο πάνω, κύριος στόχος είναι η μελέτη της βιολογικής δράσης μιας νέας χημικής ένωσης ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο για τον καρκίνο των ωοθηκών.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές A2780 και A2780CP, οι οποίες προέρχονται από ένα ενδομήτριο αδενοκαρκίνωμα των ωοθηκών σε μια ασθενή που δεν έχει λάβει αγωγή και χρησιμοποιείται συνήθως ως μοντέλο καρκίνου των ωοθηκών.

Για να εξεταστεί ο μοριακός μηχανισμός δράσης της νέας χημικής ένωσης «compound 127» και οι αλλαγές που προκαλεί στα βασικά μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA χρησιμοποιήθηκαν δυο κυτταρικές σειρές: μια ευαίσθητη στην πλατίνα (A2780) και μια ανθεκτική στην πλατίνα (A2780CP) ωοθηκική κυτταρική σειρά.

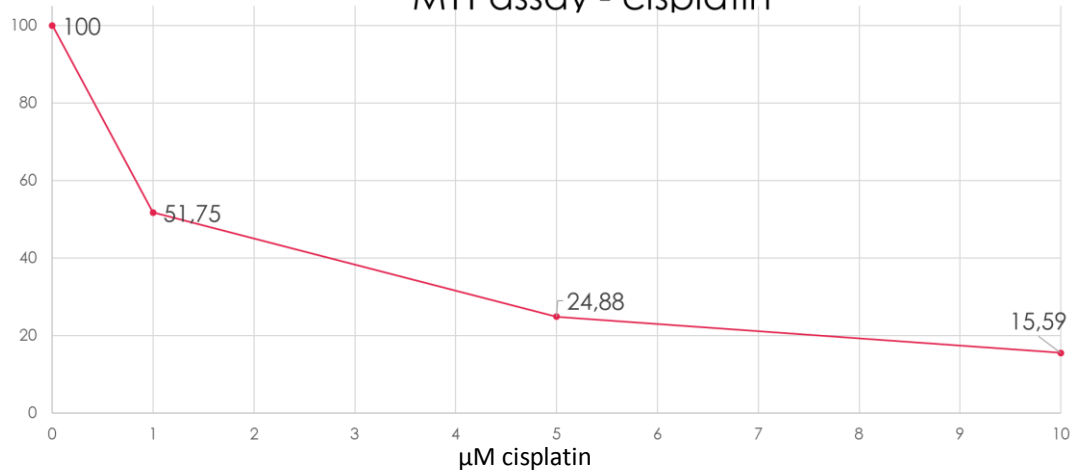
Για τη διερεύνηση της κυτταροτοξικής δράσης της νέας ένωσης (compound 127), εφαρμόστηκε η τεχνική MTT assay σε κύτταρα A2780, αλλά και A2780CP όπου εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις cisplatin και «compound 127». Με αυτόν τον τρόπο ελέγχθηκε η ικανότητά τους να μεταβάλλουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού και τη βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών.

Αρχικά, έγινε έλεγχος για την κυτταρική σειρά A2780, όπου οι συγκεντρώσεις των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για το cisplatin ήταν από 0 – 10 μM , ενώ για την compound 127 από 0 - 1 μM . Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ουσίας «compound 127» μέχρι τα 5 μM και του cisplatin μέχρι τα 50 μM έτσι ώστε να βρεθεί το IC 50 (IC50: inhibitory concentration, η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση, ένα μέτρο της ισχύος μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής / βιοχημικής λειτουργίας στο 50%), όπως φαίνεται και στο πιο κάτω διάγραμμα (εικόνα 12 Α).

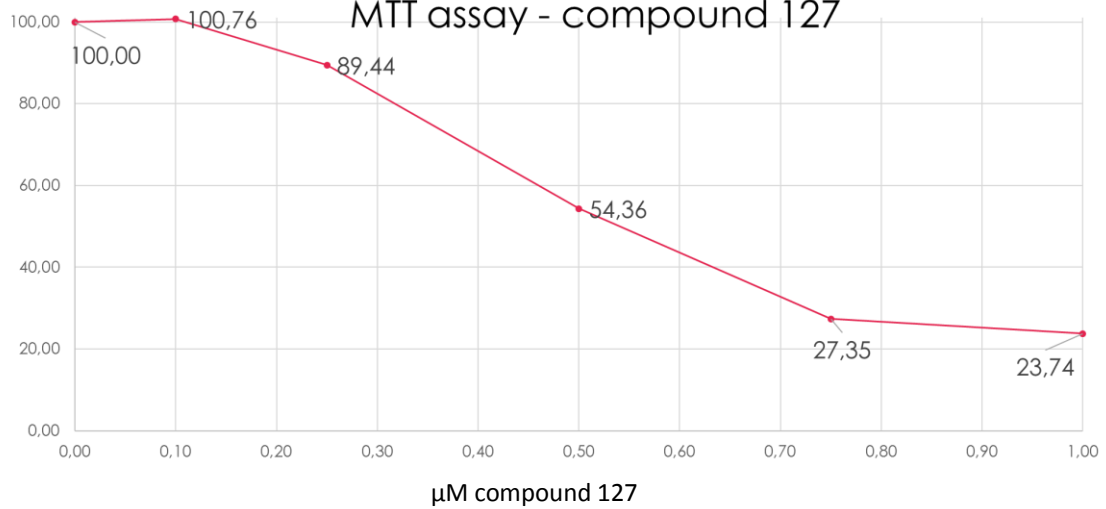
Η συνέργεια των δυο ουσιών που εξετάζονται υφίσταται όταν το άθροισμα των δυο ουσιών είναι μεγαλύτερο από ότι το IC 50 των ουσιών ξεχωριστά, δηλαδή $[(IC\ 50)_{127} + (IC\ 50)_{Cisplatin}] > [(IC\ 50)_{127}]$, όπως φαίνεται στο τελευταίο διάγραμμα του σχήματος 12 (Α) που βρίσκονται οι δυο ουσίες σε συνδυασμό. Παρατηρώντας το διάγραμμα του σχήματος 12 (Α) παρατηρούμε ότι το IC 50 βρίσκεται στο 0,50 μM της «compound 127», ενώ για το cisplatin σε 1 μM , δηλαδή σε διπλάσια συγκέντρωση από την «compound 127».

A

MTT assay - cisplatin

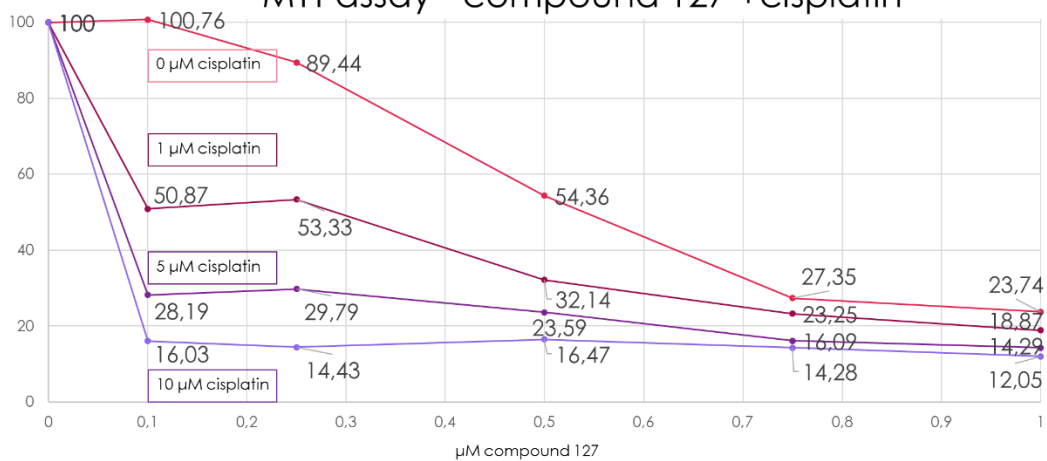


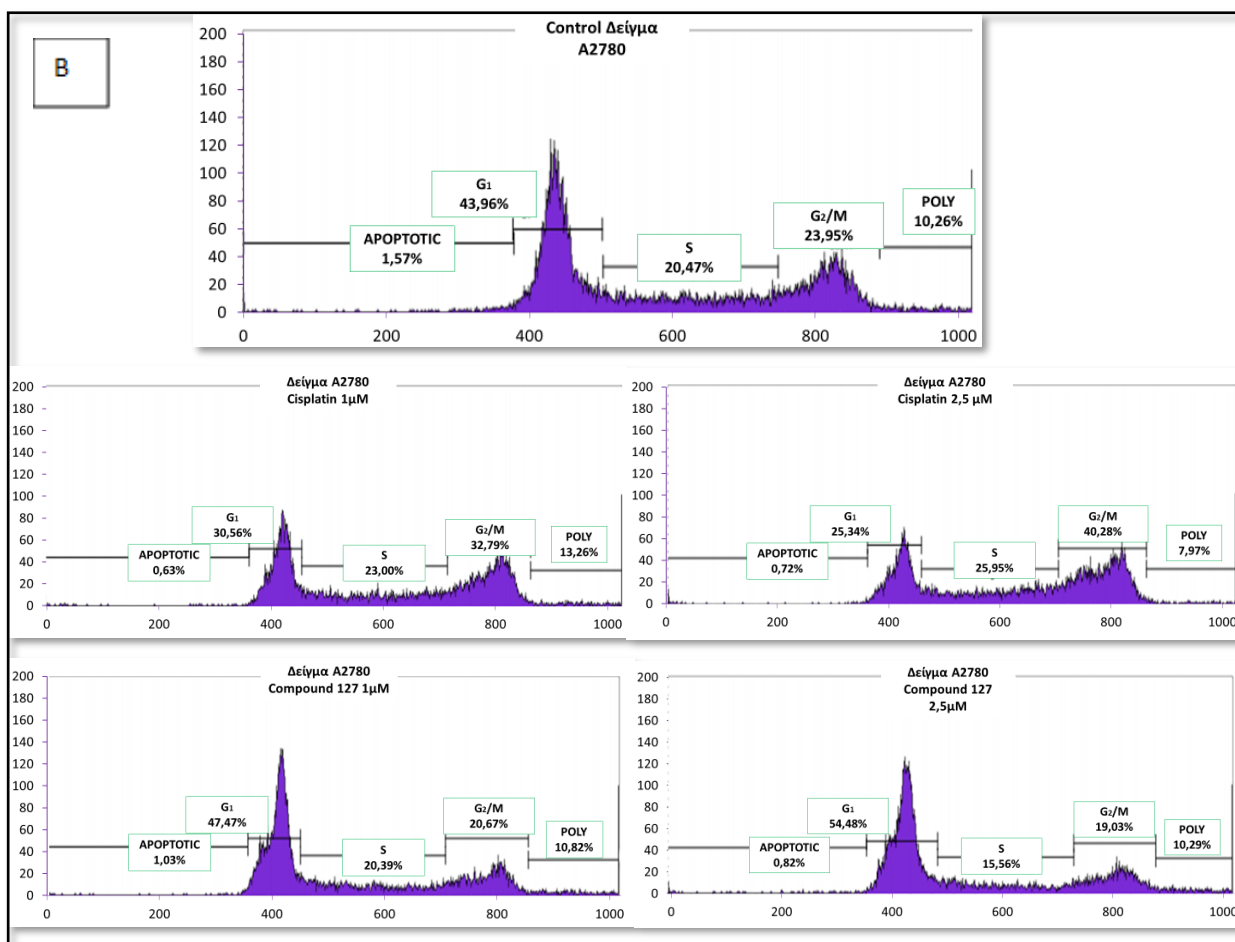
MTT assay - compound 127



MTT assay - compound 127 + cisplatin

A2780





Εικόνα 12: Αποτελέσματα από πειραματικές διαδικασίες για την κυτταροτοξικότητα των δυο ουσιών.

A. Διαγράμματα από την πειραματική διαδικασία MTT assay για τις δυο ουσίες (Cisplatin, compound 127) και των συνδυασμών αυτών.

B. Τα διαγράμματα από τους κυτταρικούς κύκλους των δειγμάτων, στα οποία προστέθηκαν τα δυο φάρμακα για 8 ώρες. Παρουσιάζονται οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G₁, S, G₂/M) μαζί με τα απλοειδικά και πολυπλοειδικά κύτταρα.

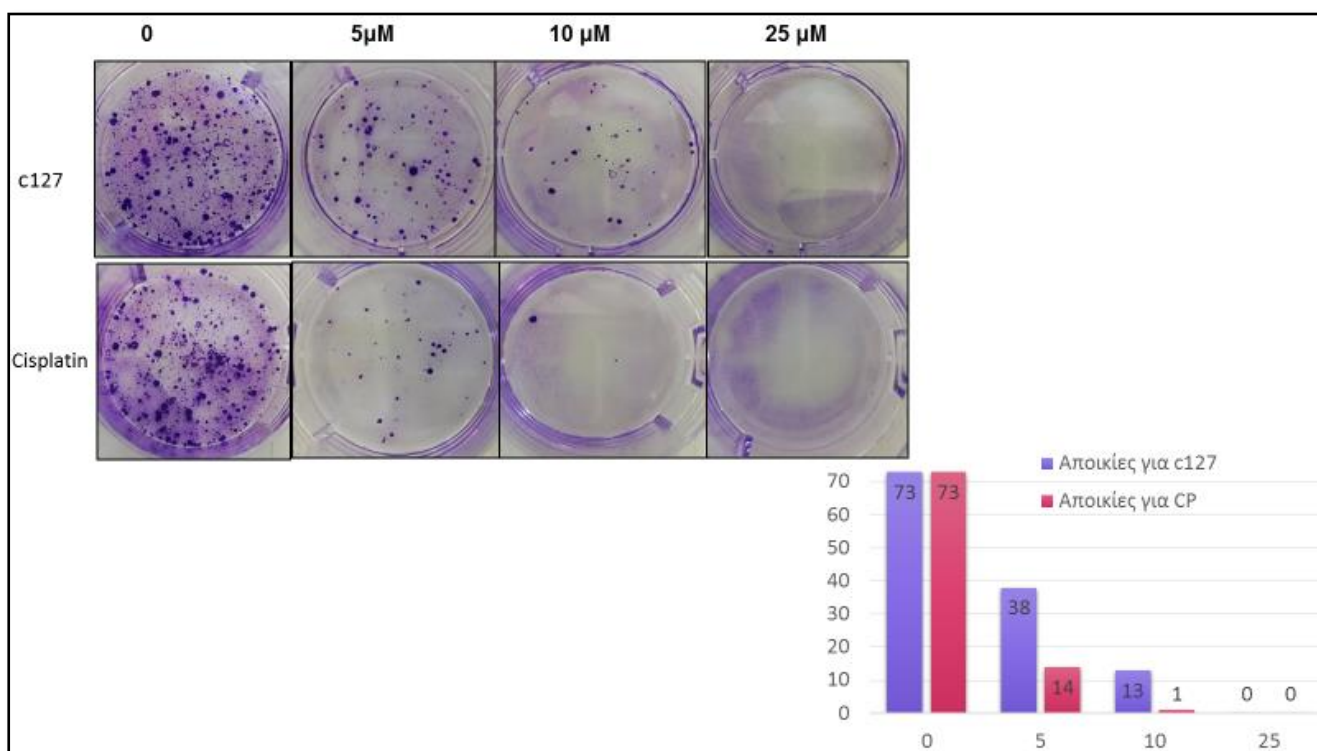
Στο πιο πάνω διάγραμμα (εικόνα 12 Β) απεικονίζεται και ο κυτταρικός κύκλος για τη «compound 127», πάντα σε σύγκριση με το cisplatin. Στο αριστερό μέρος κάθε διαγράμματος βρίσκονται τα αποπτωτικά κύτταρα, σε πολύ μικρά ποσοστά, ακολουθεί η φάση G₁ και έπειτα η φάση S όπου ο κυτταρικός πληθυσμός αποτελείται από μεταβατικά κύτταρα. Στη συνέχεια, η φάση G₂/M και τέλος στο δεξί μέρος βρίσκονται τα πολυπλοειδικά κύτταρα. Η αναγνώριση της G₂ φάσης σε σχέση με τη G₁ είναι η διπλή ένταση φθορισμού (850, 425), λόγω του διπλάσιου ποσοστού του γενετικού υλικού.

Όσον αφορά το φάρμακο cisplatin, παρατηρούμε αύξηση του ποσοστού κυττάρων στην G₂/M φάση από την G₁, από 1 μM (**30,76 → 32,79 %**) σε 2,5 μM (**25,34 → 40,28 %**) συγκέντρωση. Ενώ, όσον αφορά την νέα ένωση «compound 127», παρατηρούμε αύξηση του ποσοστού κυττάρων στην G₁ από τη G₂/M φάση, δηλαδή από 1 μM (**20,67 → 47,47 %**) σε 2,5 μM (**19,03 → 54,48 %**).

Έτσι, συγκριτικά, παρατηρούμε, ότι στην φάση G₁ τη μεγαλύτερη αύξηση έχει η κυτταρική σειρά A2780 με την προσθήκη 2,5 μM από την «compound 127», ακολουθεί η προσθήκη 1 μM από την ένωση «compound 127». Στη φάση S, δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στα ποσοστά, ενώ στη φάση G₂/M, η μεγαλύτερη αύξηση είναι όταν γίνεται προσθήκη 2,5 μM του φαρμάκου cisplatin.

Σε σχέση με το δείγμα χωρίς την επίδραση φαρμάκου, τη μεγαλύτερη διαφορά έχει στη φάση G₁ (**43,96%**), όπου η κυτταρική σειρά A2780 με προσθήκη 2,5 μM «compound 127» έχει μεγαλύτερο ποσοστό (**54,48%**) ενώ με προσθήκη 1 μM «compound 127» το ποσοστό ανέρχεται στο **47,47%**. Στην G₂/M φάση, με προσθήκη 2,5 μM του cisplatin έχει σχεδόν διπλάσια διαφορά (**40,28%**) από το δείγμα στο οποίο δεν έχει την επίδραση από καμία ουσία (**23,95%**).

Μια επιπλέον τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την κυτταροτοξικότητα της «compound 127» είναι το colony formation, όπου το αποτέλεσμα απεικονίζεται στην *εικόνα 13*. Καλλιεργήθηκαν μόνο 700 κύτταρα ανά πηγάδι, χωρίς να έχει πλέον την επίδραση των ουσιών που εξετάζονται: «compound 127» και cisplatin. Βάσει των αποτελεσμάτων του MTT assay, αναμένουμε οι αποικίες που θα αναπτύσσονταν για τη «compound 127», να είναι λιγότερες από αυτές του φαρμάκου cisplatin. Όμως, σε αυτό το πείραμα οι αποικίες για την ουσία cisplatin είναι λιγότερες από την «compound 127». Για παράδειγμα, στο δείγμα το οποίο δεν έχει επίδραση από κανένα φάρμακο, ο αριθμός των αποικιών είναι 73. Αυτός ο αριθμός μειώνεται με την επίδραση και των δυο ουσιών που μελετάμε. Οι αποικίες με επίδραση από την «compound 127» για μόλις 5 μM είναι τριάντα-οκτώ (38), ενώ με 10 μM υπάρχουν δεκατρείς (13) και τέλος με 25 μM δεν απομένει καμία αποικία. Ενώ, οι αποικίες για το cisplatin για τα 5 μM είναι δεκατέσσερις (14), ενώ με τη διπλάσια συγκέντρωση μόλις μια (1) αποικία και τέλος για 25 μM καμία αποικία.



Εικόνα 13: Φωτογραφική απεικόνιση της τεχνικής colony formation, όπου παρατηρούνται οι αποικίες της κυτταρικής σειράς A2780 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις για το cisplatin και την «compound 127».

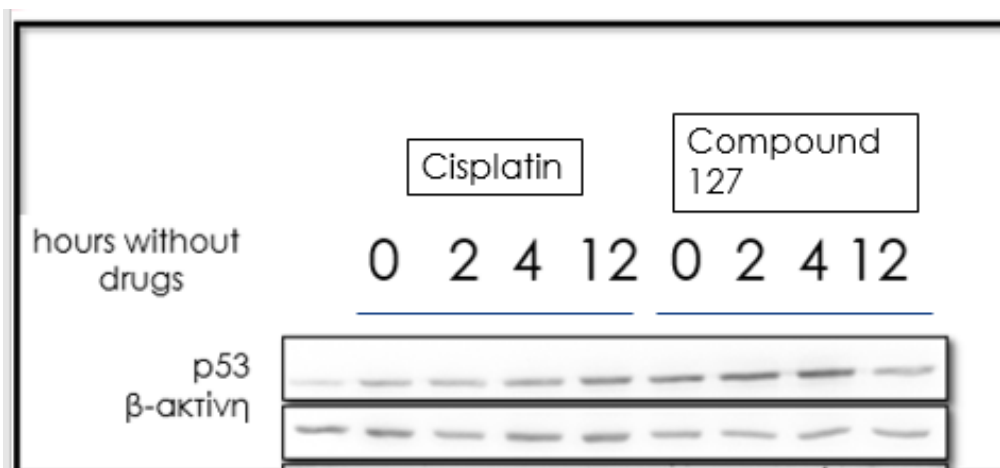
Για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης των δυο ουσιών που εξετάζονται, αρχικά αναλύσαμε τα επίπεδα έκφρασης βασικών μονοπατιών που σχετίζονται με αντίδραση στο γενωμικό στρες όπως είναι οι πρωτεΐνες p53 και γ-H2AX.

Βάσει βιβλιογραφίας, αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη p53 είναι ένας δεσμευτής DNA ολιγομερών και ενεργοποιητής για τη μεταγραφή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ρόλος του p53 είναι να ρυθμίζει τη διακοπή της ανάπτυξης και τα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση ως απάντηση σε σήματα στρες, επηρεάζοντας έτσι τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η γ-H2AX είναι η πρωτεΐνη παραλλαγή της ιστόνης που αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των συνολικών πρωτεϊνών ιστόνης H2A σε φυσιολογικούς ινοβλάστες στον άνθρωπο. Η H2A.X απαιτείται για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου με τη μεσολάβηση του σημείου ελέγχου και για την επιδιόρθωση του DNA μετά από θραύσεις στο δίκλωνο DNA. Η βλάβη στο DNA από ιοντίζουσα ή υπεριώδη ακτινοβολία ή άλλους παράγοντες έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία φωσφορυλίωση της H2A.X στη Ser139 από κινάσες τύπου PI3K όπως είναι οι ATM, ATR. Αυτό το πρώιμο γεγονός της βλάβης DNA απαιτείται για την πρόσληψη ενός πλήθους πρωτεϊνών απόκρισης DNA - βλάβης, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών MDC1, NBS1, RAD50, MRE11, 53BP1 και BRCA1. Έτσι λοιπόν, η H2A.X έχει ρόλο στην επιδιόρθωση της βλάβης του DNA και απαιτείται για τον κατακερματισμό του DNA κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Μετά τη βλάβη του DNA και ταυτόχρονα με τη φωσφορυλίωση της Ser139, η Tyr142 αποφωσφορυλιώνεται σε θέσεις βλάβης του DNA από τις φωσφατάσες που προσλαμβάνονται, ενώ η φωσφορυλίωση στη Ser139 διευκολύνει την πρόσληψη πρωτεϊνών επισκευής DNA και αποπτωτικών πρωτεϊνών στις θέσεις βλάβης του DNA.

Για να εξεταστεί ο μηχανισμός της κυτταροτοξικής δράσης, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες δόσεις του cisplatin (0, 2,5, 5, 25 μ M) και της «compound 127» (2,5 και 5 μ M) για οκτώ (8) ώρες, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η βέλτιστη συγκέντρωση και συσχέτιση μεταξύ των δυο ουσιών (εικόνα 14 Α). Στα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης (western blot) για το συγκεκριμένο πείραμα, παρατηρούνται τα δείγματα που εκτέθηκαν, ανά σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης ουσιών (cisplatin και «compound 127»), και χωρισμένα ανά την ουσία που έχει προστεθεί. Τα μέγιστα επίπεδα των δειγμάτων παρατηρήθηκαν ότι είναι ίδια για τα 25 μ M του φαρμάκου cisplatin με την υπο-δεκαπλάσια συγκέντρωση της νέας ένωσης «compound 127».

Έπειτα, κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση των ουσιών τόσο του cisplatin όσο και της «compound 127» στα 5 μ M, έγινε έλεγχος εύρεσης της βέλτιστης ώρας δράσης. Έτσι, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε έκθεση φαρμάκων για τέσσερις (4), οκτώ (8) και δεκαέξι (16) ώρες, όπου ελέγχθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών p53, p-JNK, γ -H2AX, καθώς και η β -ακτίνη και GAPDH (εικόνα 14B). Τα δείγματα βρίσκονται ανά σειρά με τις ώρες έκθεσης στις συγκεκριμένες ουσίες, πρώτα για το cisplatin και μετά για την «compound 127». Συγκρίνοντας τις ίδιες ώρες για τις δυο αυτές ουσίες, παρατηρείται πιο έντονη έκφραση για την «compound 127». Αρχικά, για τις τέσσερις ώρες η έκφραση του p53 είναι αρκετά πιο έντονη για την «compound 127», ενώ στις οκτώ ώρες η διαφορά στην έκφραση είναι ακόμη πιο έντονη, καθώς είναι η ώρα με την πιο μεγάλη έκφραση. Στις δεκαέξι ώρες έκθεσης των ουσιών, η έκφραση του p53 για τις δυο ουσίες είναι σχεδόν ίδια. Επιπλέον, παρατηρώντας την πρωτεΐνη γ -H2AX, η έκφρασή της είναι έντονη μόνο στις οκτώ και δεκαέξι ώρες για την «compound 127». Επομένως, η βέλτιστη ώρα έκθεσης για την «compound 127» είναι οι οκτώ ώρες όπου υπάρχει έντονη επαγωγή της πρωτεΐνης p53 και φωσφορυλίωση της γ -H2AX.

Όλα τα δείγματα έχουν κανονικοποιηθεί έναντι των πρωτεϊνών GAPDH ή β -ακτίνης ως έλεγχο φόρτωσης τους.



Εικόνα 15: Μελέτη επίδρασης των δυο ουσιών βάσει τις πρωτεΐνες p-53 και γ-H2AX, με έλεγχο φόρτωσης από τη β-ακτίνη. Επίδραση θρεπτικού μέσου χωρίς επίδραση φαρμάκου για 2 μέχρι 12 ώρες.

Τα κύτταρα με ευαισθησία στην πλατίνα (A2780) εκτέθηκαν στο cisplatin (25 μ M) και στην «compound 127» (5 μ M) για οκτώ (8) ώρες και ακολούθησε επώαση με θρεπτικό μέσο χωρίς φάρμακο για 2 ή 4 ή 12 ώρες. Αυτό το πείραμα γίνεται για να μελετηθεί η απόκριση των κυττάρων δηλαδή για την επίδραση του φαρμάκου σε σχέση με την επιβίωση και ανάπτυξη των κυττάρων.

Στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (A2780), παρατηρούμε ότι μπορεί η αύξηση του p53 να αργεί να εμφανιστεί όμως αυξάνεται και διατηρείται για περισσότερες ώρες στο cisplatin, μέχρι και δώδεκα ώρες μετά την επίδραση του. Ενώ, για τη «compound 127» παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων του p53 αλλά δε διατηρείται. Για τη «compound 127» τα επίπεδα του p53 επανέρχονται πιο γρήγορα στον κύκλο των δώδεκα ωρών σημαίνει ότι υπάρχει διαφορετικός μηχανισμός δράσης με πιθανόν διαφορετικό μηχανισμό επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το υψηλό ποσοστό της θνησιμότητας για τον καρκίνο των ωοθηκών σχετίζεται κυρίως με την αντίσταση στο φάρμακο cisplatin. Έτσι, η εύρεση ενός νέου φαρμάκου θεωρείται μονόδρομος σε τέτοιου είδους καρκίνο, ο οποίος εμφανίζεται κυρίως σε μεταγενέστερο στάδιο, όπου ως θεραπεία χρησιμοποιείται η χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα και την ταξόλη. Δυστυχώς, στον καρκίνο των ωοθηκών, δεν υπάρχουν πιο εξειδικευμένα φάρμακα. Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής έγινε μελέτη μιας νέας χημικής ένωσης, ως ένα νέο χημειοθεραπευτικό φάρμακο.

Η μελέτη της νέας ένωσης «compound 127», αφορά την κυτταροτοξικότητά της και τη διερεύνηση της συνέργειάς της με άλλα φάρμακα. Στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι η σύγκριση με το κύριο χημειοθεραπευτικό φάρμακο, το cisplatin, γνωστό ως πλατίνα.

Αρχικά, έγινε προσπάθεια εύρεσης της βέλτιστης δόσης και της ώρας επίδρασης βιωσιμότητας των κυττάρων για την «compound 127». Με βάση τα πειράματα που διεξήχθησαν, όπως παρουσιάζονται στην *εικόνα 14 (Α)* τα μέγιστα επίπεδα των δειγμάτων παρατηρήθηκαν ότι είναι ίδια στα 25 μM του φαρμάκου cisplatin με την υπο-δεκαπλάσια συγκέντρωση της νέας ένωσης «compound 127», η οποία είναι τα 2,5 μM . Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι με μικρότερη συγκέντρωση της «compound 127» μπορούμε να πετύχουμε τη βέλτιστη επαγωγή της p53 το οποίο σχετίζεται με την απόπτωση των κυττάρων. Ακόμη, η βέλτιστη ώρα επίδρασης της ουσίας που μελετάμε βρέθηκε ότι είναι οι οκτώ (8) ώρες, η ώρα με το καλύτερο αποτέλεσμα για την επαγωγή της p53, καθώς και για τις πρωτεΐνες p-JNK και $\gamma\text{-H2AX}$.

5.1 Κυτταροτοξικότητα

Η κυτταροτοξικότητα της ένωσης αυτής ελέγχθηκε με δυο διαφορετικές τεχνικές, την MTT assay και το colony formation.

Μέσα από τα πειράματα συμπεραίνεται ότι ο συνδυασμός των δυο ουσιών δίνει ένα αποτέλεσμα το οποίο είναι καλύτερο από ότι η κάθε ουσία ξεχωριστά, όπως φαίνεται και από την *εικόνα 12 (Α)*. Από τη διαδικασία αυτή, συμπεραίνεται ότι η νέα ένωση που μελετάται «compound 127» έχει μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση σε μικρές χρονικές περιόδους επειδή επάγει πιο γρήγορα τον κυτταρικό θάνατο σε σύγκριση πάντα με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο cisplatin. Αυτό το γεγονός θεωρείται πλεονέκτημα της ένωσης αυτής, προσδίδοντάς της γρηγορότερη δράση.

Ωστόσο, συγκρίνοντας τις δυο μεθόδους μεταξύ τους, παρατηρούμε διαφορές, κυρίως στη χρονική περίοδο επώασης, μιας και στην MTT assay η χρονική περίοδος επώασης ήταν για 72 συνεχείς ώρες με τις δυο ουσίες, ενώ στη colony formation μόλις για οκτώ (8) ώρες, μια πιο σύντομη χρονική επώαση.

Στη τεχνική colonic formation κατά τη μικρότερη χρονική επίδραση της νέας ένωσης αναμένουμε οι αποικίες που θα αναπτύσσονταν για τη «compound 127», να είναι λιγότερες από αυτές του φαρμάκου cisplatin. Όμως, στο πείραμα οι αποικίες που αναπτύσσονται είναι περισσότερες για την «compound 127».

Με τα πιο πάνω πειράματα συμπεραίνεται ότι η «compound 127» χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να δράσει από το cisplatin σκοτώνοντας περισσότερα καρκινικά κύτταρα. Αυτό εξηγείται με αιτιολογίες, ότι τα κύτταρα έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει διαφορετικό μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA. Επίσης, πιθανόν θεωρείται ότι η είσοδος της «compound 127» στα κύτταρα είναι πιο αργή. Για να απαντηθούν τα ερωτήματα που δημιουργήθηκαν, μελετάμε την επίδραση των φαρμάκων αυτών (cisplatin και «compound 127») στον κυτταρικό κύκλο, καθώς επίσης και τα επιπέδα των πρωτεϊνών p53 και γ-H2AX, ως δείκτες βλάβης στο DNA.

5.2 Επαγωγή βλάβης στο DNA:

Η ένωση που μελετάται επάγει την απόπτωση και την καταστολή του πολλαπλασιασμού.

Στην ανάλυση αυτή παρατηρούμε τις διαφορές του κυτταρικού κύκλου στη μετάβαση των κυττάρων από τη μια φάση στην άλλη. Όσον αφορά την «compound 127», παρατηρούμε αύξηση του ποσοστού κυττάρων στην G_1 φάση, από την G_2/M φάση, ενώ όσον αφορά το cisplatin, παρατηρούμε αύξηση του ποσοστού κυττάρων στην G_2/M φάση από την G_1 . Οι δυο ουσίες (cisplatin, «compound 127») συγκεντρώνουν κύτταρα σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου κι αυτό σημαίνει ότι δρουν με διαφορετικό μηχανισμό, παρόλο που και οι δυο ουσίες προκαλούν επαγωγή βλάβης στο DNA.

Βάσει των αποτελεσμάτων από τα Western blot που έχουν διεξαχθεί για να μελετήσουμε τα επίπεδα των πρωτεϊνών p53 και γ -H2AX (δείκτες βλαβών στο DNA). Τα επίπεδα είναι υψηλότερα για την «compound 127» και αυτό υποδεικνύει ότι οι διαφορές στην κυτταροτοξικότητα που προαναφέραμε μάλλον, δεν ωφείλονται στη δεύτερη υπόθεση που τέθηκε για αργή είσοδο της «compound 127» στα κύτταρα, αλλά στην ύπαρξη διαφορετικού μηχανισμού δράσης και διαφορετικού μηχανισμού επιδιόρθωσης των βλαβών που δημιουργούνται στο DNA. Αυτό αιτιολογείται από την μεγαλύτερη έκφραση των επιπέδων ακόμα και από τις τέσσερις ώρες επώασης με την «compound 127».

Επίσης, παρατηρούμε ότι μπορεί η αύξηση του p53 να αργεί να εμφανιστεί όμως αυξάνεται και διατηρείται για περισσότερες ώρες στο cisplatin, μέχρι και δώδεκα ώρες μετά την επίδραση του. Ενώ, για τη «compound 127» παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων του p53 αλλά δε διατηρείται. Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο μηχανισμός δράσης της «compound 127» διαφέρει και πολύ πιθανόν, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης της βλάβης στο DNA να είναι διαφορετικός από του cisplatin.

Συμπερασματικά, η νέα ένωση φαίνεται να έχει χημειοθεραπευτική δράση σε μικρότερη συγκέντρωση από το cisplatin επειδή επάγει πιο γρήγορα τον κυτταρικό θάνατο, μπορεί χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να δράσει από το cisplatin σκοτώνοντας περισσότερα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, συγκεντρώνεται σε διαφορετική φάση στον κυτταρικό κύκλο από το cisplatin κι αυτό σημαίνει ότι δρα με διαφορετικό μηχανισμό από αυτό και πιθανώς με διαφορετικό μηχανισμό επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA.

5.3 Μελλοντικές προοπτικές της θεραπείας:

Η θεραπεία για τον καρκίνο των ωοθηκών εγείρει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον για την εύρεση της βέλτιστης θεραπείας που θα επιφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Κατά την επόμενη δεκαετία είναι σίγουρο ότι θα προκύψουν περισσότερα φάρμακα πιο δραστικά και στοχευμένα.

Με βάσει τη διπλωματική εργασία και τα αποτελέσματα αυτής θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να γίνει λεπτομερής ανάλυση του μηχανισμού δράσης της «compound 127», καθώς επίσης και του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA. Επίσης, ενδιαφέρον θα είναι μια μελέτη για τις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν στην G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου, στην οποία όπως φαίνεται συσσωρεύονται τα κύτταρα με την επίδραση της «compound 127». Η μελέτη των πρωτεϊνών αυτών σε σχέση με την απόκριση της νέας ουσίας θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της δράσης της.

Επιπλέον, οι νεότερες στοχευμένες θεραπείες, όπως τα αντι-αγγειογενετικά φάρμακα ή οι αναστολείς της PARP, συνεισφέρουν στη βελτίωση της επιβίωσης και θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί η νέα χημική ένωση «compound 127» ως προς τη συνέργεια της με αυτά τα φάρμακα.

Τέλος, σημαντική αναμένεται να είναι η συμβολή μελέτης της αντικαρκινικής δράσης in vivo σε μοντέλα ποντικών, με στόχο την αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών. Η βελτίωση της αποτελεσματικότητας των παραπάνω φαρμάκων είναι επιτακτική ανάγκη και θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μεγάλες κλινικές μελέτες που να διερευνούν σε βάθος τους μοριακούς μηχανισμούς της ένωσης αυτής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΕΠΙΛΟΓΟΣ:

Η ανακάλυψη φαρμάκων στην περιοχή του καρκίνου των ωοθηκών συνεχίζει να ξεκινά σημαντικές νέες κλινικές δοκιμές. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στο φάρμακο, είτε η μετάλλαξη στόχος είτε η επαγωγή εναλλακτικών οδών σηματοδότησης, έχει επισημάνει τη συνεχιζόμενη ανάγκη για πρόσθετους παράγοντες έναντι νέων στόχων. Απαιτούνται συμπληρωματικές έρευνες για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού και της δράσης αυτής της θανατηφόρου νόσου, με στόχο την καλύτερη πρόληψη και την έγκαιρη ανίχνευση.

Η αυξημένη και πρόωρη χρήση των αντισυλληπτικών χαπιών από το στόμα πιθανότατα συνέβαλε στην μείωση της εμφάνισης καρκίνου που παρατηρήθηκε στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, ενώ οι αλλαγές στη διατροφή και η σωματική άσκηση θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ένα ρόλο στις αυξανόμενες τάσεις που παρατηρούνται σε πολλές χώρες με οικονομική ανάπτυξη.

Ο απώτερος στόχος με αυτόν τον τύπο ανάπτυξης φαρμάκων είναι η επίτευξη παρατεταμένης ύφεσης και βελτιωμένης ποιότητας ζωής, για ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών.

Καθώς η ενσωμάτωση των αντισυμβατικών παραγόντων ενσωματώνεται όλο και περισσότερο στις κλινικές δοκιμές και πρακτικές, η ελπίδα είναι ότι η ανακάλυψη φαρμάκων θα ενθαρρυνθεί σε όλους τους τομείς της θεραπείας του καρκίνου, από τη βελτίωση της ικανότητάς μας να προβλέψουμε την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, την ενίσχυση της παράδοσης φαρμάκων σε στοχευμένους ιστούς.

Το μέλλον της θεραπείας του καρκίνου να κινείται προς μια πιο εξατομικευμένη προσέγγιση, όπου στόχος είναι να προσδιοριστεί ένα μεμονωμένο προφίλ καθώς και οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται και στοχεύουν τις κύριες οδούς του καρκίνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 2: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
EOC: Epithelial Ovarian Cancer	Επιθηλιακός Καρκίνος Των Ωοθηκών
HNPCC: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer	Κληρονομούμενος Μη Πολυποδιασικός Καρκίνος Παχέος Εντέρου
RR: Relative Risk	Ρίσκο Επικινδυνότητας
BMI: Body Mass Index:	Δείκτης Μάζας Σώματος
HRT: Hormone Replacement Therapy	Θεραπεία Αντικατάστασης Ορμονών
ROC: Recurrent Ovarian Cancer	Υποτροπιάζον Καρκίνος των Ωοθηκών
SC: Serous Carcinoma	Ορώδης Καρκίνωμα
HGSC: High Grade Serous Carcinoma	Υψηλού Βαθμού Ορώδης Καρκίνωμα
LGSC: Low-Grade Serous Carcinoma	Χαμηλού Βαθμού Ορώδης Καρκίνωμα
STIC: Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma	Σωληνοειδές ενδοεπιθηλιακό ορώδες καρκίνωμα,
WHO: World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
CCC: Clear-Cell Carcinoma	Διαυγής Καρκινικά Κύτταρα

NICE: National Institute for Health and Care Excellence	Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Φροντίδας
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακό Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντα
FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics	Διεθνή Ομοσπονδία Γυναικολογίας και Μαιευτικής
SDS: Secondary Debulking Surgery	Δευτερογενής χειρουργική επέμβαση
PFI: Platinum Free Interval	Ελεύθερος Χρόνος Διαστήματος
RD:	Ανθεκτική Νόσος
PR:	Ασθένεια Ανθεκτική Σε Πλατίνα
PPS:	Μερική Ευαισθησία Στην Πλατίνα
PS:	Ευαίσθητη Σε Πλατίνα Ασθένεια
OC: Oral Contraceptives	Αντισυλληπτικά Μέσω Του Στόματος
CT: Computed Tomography	Αξονική Τομογραφία
PET: Positron Emission Tomography	Ποζιτρονική Τομογραφία
MRI: Magnetic Resonance Imaging	Μαγνητική Τομογραφία
iPARP: inhibitors poly ADP ribose polymerase	Αναστολείς PARP
FDA: Food and Drug Administration	Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων

EMA: European Medicines Agency	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
-----------------------------------	--------------------------------

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

- EOC: Epithelial Ovarian Cancer
- OC: Oral Contraceptives
- RR: Relative Risk
- BMI: Body Mass Index:
- HNPCC: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
- HRT: Hormone Replacement Therapy
- ROC: Recurrent Ovarian Cancer
- SC: Serous Carcinoma
- HGSC: *High-Grade Serous Carcinoma*
- LGSC: *Low-Grade Serous Carcinoma*
- STIC: *Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma*
- WHO: World Health Organization
- CCC: Clear-Cell Carcinoma
- NICE: National Institute for Health and Care Excellence
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
- FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics
- SDS: Secondary Debulking Surgery
- PFI: Platinum Free Interval
- RD: Ανθεκτική Νόσος
- PR: Ασθένεια Ανθεκτική Σε Πλατίνα
- PPS: Μερική Ευαισθησία Στην Πλατίνα
- PS: Ευαίσθητη Σε Πλατίνα Ασθένεια
- CT: *Computed Tomography*
- PET: *Positron Emission Tomography*
- MRI: *Magnetic Resonance Imaging*
- iPARP: Inhibitors Poly ADP Ribose Polymerase
- FDA: Food and Drug Administration
- EMA: European Medicines Agency

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Tworoger SS, Shafrir AL, Hankinson SE. Ovarian cancer. *Nature*. 2016;2:889-908. doi:10.1093/oso/9780190238667.003.0046
2. De Cecco L, Marchionni L, Gariboldi M, et al. Gene expression profiling of advanced ovarian cancer: characterization of a molecular signature involving fibroblast growth factor 2. *Oncogene*. 2004;23:8171-8183. doi:10.1038/sj.onc.1207979
3. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-1945. doi:10.1101/gad.1212704
4. Choi HJ, Heo JH, Park JY, et al. A novel PI3K/mTOR dual inhibitor, CMG002, overcomes the chemoresistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2019;153(1):135-148. doi:10.1016/j.ygyno.2019.01.012
5. Rogers-Broadway KR, Chudasama D, Pados G, et al. Differential effects of rapalogues, dual kinase inhibitors on human ovarian carcinoma cells in vitro. *Int J Oncol*. 2016;49(1):133-143. doi:10.3892/ijo.2016.3531
6. La Vecchia C. Ovarian cancer: Epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev*. 2017;00(1):55-62. doi:10.1097/CEJ.0000000000000217
7. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J cancer*. 2010;127(12):2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
8. Lowe KA, Chia VM, Taylor A, et al. An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecol Oncol*. 2013;130(1):107-114. doi:10.1016/j.ygyno.2013.03.026
9. Sung PL, Chang YH, Chao KC, Chuang CM. Global distribution pattern of histological subtypes of epithelial ovarian cancer: A database analysis and systematic review. *Gynecol Oncol*. 2014;133(2):147-154. doi:10.1016/j.ygyno.2014.02.016
10. Bray F, Loos AH, Tognazzo S, La Vecchia C. Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953-2000. *Int J Cancer*. 2005;113(6):977-990. doi:10.1002/ijc.20649

11. Turati F, Galeone C, Gandini S, et al. High glycemic index and glycemic load are associated with moderately increased cancer risk. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(7):1384-1394. doi:10.1002/mnfr.201400594
12. Cibula D, Gompel A, Mueck AO, et al. Hormonal contraception and risk of cancer. *Hum Reprod Update*. 2010;16(6):631-650. doi:10.1093/humupd/dmq022
13. Bosetti C, Bertuccio P, Malvezzi M, et al. Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Ann Oncol*. 2013;24(10):2657-2671. doi:10.1093/annonc/mdt301
14. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA CANCER J CLIN*. 2016;66(1):7-30. doi:10.3322/caac.21551
15. Yang HP, Anderson WF, Rosenberg PS, et al. Ovarian cancer incidence trends in relation to changing patterns of menopausal hormone therapy use in the United States. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2146-2151. doi:10.1200/JCO.2012.45.5758
16. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN*. 2011;61(2):69-90. doi:10.3322/caac.20107.Available
17. Sant M, Chirlaque Lopez MD, Agresti R, et al. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999-2007: Results of the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer*. 2015;51(15):2191-2205. doi:10.1016/j.ejca.2015.07.022
18. Kelly L. Bolton, Georgia Chenevix- Trench, Cindy Goh S et al. Association Between BRCA1 and BRCA2 Mutations and Survival in Women With Invasive Epithelial Ovarian Cancer. *JAMA*. 2012;307(4):382-390. doi:10.1111/j.1440-1819.2010.02123.x
19. Casagrande JT, Pike MC, Ross RK, Louie EW, Roy S, Henderson BE. "Incessant Ovulation" and Ovarian Cancer. *Lancet*. 1979;314(8135):170-173. doi:10.1016/S0140-6736(79)91435-1
20. Pelucchi C, Galeone C, Talamini R, et al. Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(1):83.e1-83.e7. doi:10.1016/j.ajog.2006.06.088

21. Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, et al. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nat Genet.* 1994;8(4):387-391. doi:10.1038/ng1294-387
22. Pennington KP, Swisher EM. Hereditary ovarian cancer: Beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol.* 2012;124(2):347-353. doi:10.1016/j.ygyno.2011.12.415
23. Liu G, Yang D, Sun Y, et al. Differing Clinical Impact of BRCA1 and BRCA2 mutation in serous ovarian cancer. *Pharmacogenomics.* 2012;13:1523-1535.
24. Press JZ, De Luca A, Boyd N, et al. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. *BMC Cancer.* 2008;8:1-12. doi:10.1186/1471-2407-8-17
25. Walsh T, Casadei S, Lee MK, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(44):18032-18037. doi:10.1073/pnas.1115052108
26. Stephanie Lheureux, Charlie Gourley, Ignace Vergote AMO. Epithelial ovarian cancer. *Lancet.* 2019;393(10177):1240-1253. doi:10.1016/S0140-6736(18)32552-2
27. Brett M. R, Jennifer B. P, Thomas A. S, Brett M. R, Jennifer B. P, Thomas A. S. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017;14(1):9-32. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084
28. Ketabi Z, Bartuma K, Bernstein I, et al. Ovarian cancer linked to lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors. *Gynecol Oncol.* 2011;121(3):462-465. doi:10.1016/j.ygyno.2011.02.010
29. Crispens M. Endometrial and ovarian cancer in lynch syndrome. *Clin Colon Rectal Surg.* 2012;25(2):97-102. doi:10.1055/s-0032-1313780
30. Engel C, Loeffler M, Steinke V, et al. Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J Clin Oncol.* 2012;30(35):4409-4415. doi:10.1200/JCO.2012.43.2278
31. Pearce CL, Chung K, Pike MC, Wu AH. Increased ovarian cancer risk

- associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin. *Cancer*. 2009;115(3):531-539. doi:10.1002/cncr.23956
32. Lina Steinrud Mørch, MSc Ellen Løkkegaard, MD, PhD Anne Helms Andreassen, MSc Susanne Krüger-Kjær, MD, DrMSci Øjvind Lidegaard, MD D. Hormone Therapy and Ovarian Cancer. *JAMA*. 2009;302(3):298. doi:10.4103/0976-7800.165587
 33. Vecchia C La. Estrogen-progestogen replacement therapy and ovarian cancer: An update. *Eur J Cancer Prev*. 2006;15(6):490-492. doi:10.1097/01.cej.0000205026.14515.de
 34. Negri E, Tzonou A, Beral V, et al. Hormonal therapy for menopause and ovarian cancer in a collaborative re- analysis of European studies. *Int J Cancer*. 1999;80(6):848-851. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990315)80:6<848::AID-IJC8>3.0.CO;2-E
 35. Keum N, Greenwood DC, Lee DH, et al. Adult weight gain and adiposity-related cancers: A dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(2):1-14. doi:10.1093/jnci/djv088
 36. Olsen CM, Nagle CM, Whiteman DC, et al. Obesity and risk of ovarian cancer subtypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium. *Obes risk ovarian cancer subtypes*. 2013;20(2):251-262. doi:10.1530/erc-12-0395
 37. Calle EE, Gapstur SM, Patel A V., et al. Ovarian cancer and smoking: Individual participant meta-analysis including 28 114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2012;13(9):946-956. doi:10.1016/S1470-2045(12)70322-4
 38. Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, et al. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2013;31(33):4188-4198. doi:10.1200/JCO.2013.48.9021
 39. Bassuk SS, Manson JAE. Oral contraceptives and menopausal hormone therapy: Relative and attributable risks of cardiovascular disease, cancer,

- and other health outcomes. *Ann Epidemiol.* 2015;25(3):193-200. doi:10.1016/j.annepidem.2014.11.004
40. Wentzensen N, Poole EM, Trabert B, et al. Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: An analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *J Clin Oncol.* 2016;34(24):2888-2898. doi:10.1200/JCO.2016.66.8178
 41. Parazzini F, Chatenoud L, Chiantera V, Benzi G, Surace M, La Vecchia C. Population attributable risk for ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2000;36(4):520-524. doi:10.1016/S0959-8049(99)00313-5
 42. Rice MS, Hankinson SE, Tworoger SS. Tubal ligation, hysterectomy, unilateral oophorectomy, and risk of ovarian cancer in the Nurses' Health Studies. *Fertil Steril.* 2014;102(1). doi:10.1016/j.fertnstert.2014.03.041
 43. SM D, TM F, CF S, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA.* 2010;304(9):967-975. doi:10.1001/jama.2010.1237
 44. Trabert B, Ness RB, Lo-Ciganic WH, et al. Aspirin, nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drug, and acetaminophen use and risk of invasive epithelial ovarian cancer: A pooled analysis in the ovarian cancer association consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(2). doi:10.1093/jnci/djt431
 45. C. B, E. N, S. F, et al. Olive oil, seed oils and other added fats in relation to ovarian cancer (Italy). *Cancer Causes Control.* 2002;13(5):465-470. doi:http://dx.doi.org/10.1023/A:1015760004130
 46. La Vecchia C. Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk. *Nutr Rev.* 2009;67(SUPPL. 1). doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00174.x
 47. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, et al. Cancer prevention in Europe the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev.* 2013;22(1):90-95. doi:10.1097/CEJ.0b013e328354d2d7
 48. McTiernan A. Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(3):205-211. doi:10.1038/nrc2325

49. Olsen CM, Bain CJ, Jordan SJ, et al. Recreational physical activity and epithelial ovarian cancer: A case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(11):2321-2330. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0566
50. Goff BA, Mandel LS, Drescher CW, et al. Development of an ovarian cancer symptom index: Possibilities for earlier detection. *Cancer.* 2007;109(2):221-227. doi:10.1002/cncr.22371
51. Hamilton W, Peters TJ, Bankhead C, Sharp D. Risk of ovarian cancer in women with symptoms in primary care: Population based case-control study. *BMJ.* 2009;339(7721):616. doi:10.1136/bmj.b2998
52. Lim AWW, Mesher D, Sasieni P. Estimating the workload associated with symptoms-based ovarian cancer screening in primary care: An audit of electronic medical records. *BMC Fam Pract.* 2014;15(1):1-6. doi:10.1186/s12875-014-0200-y
53. Lyratzopoulos G, Wardle J, Rubin G. Rethinking diagnostic delay in cancer: How difficult is the diagnosis? *BMJ.* 2014;349(December):1-6. doi:10.1136/bmj.g7400
54. Salani R, Backes FJ, Fung Kee Fung M, et al. Posttreatment surveillance and diagnosis of recurrence in women with gynecologic malignancies: Society of Gynecologic Oncologists recommendations. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204(6):466-478. doi:10.1016/j.ajog.2011.03.008
55. Gilbert L, Basso O, Sampalis J, et al. Assessment of symptomatic women for early diagnosis of ovarian cancer: Results from the prospective DOvE pilot project. *Lancet Oncol.* 2012;13(3):285-291. doi:10.1016/S1470-2045(11)70333-3
56. Andersen MR, Lowe KA, Goff BA. Value of symptom-triggered diagnostic evaluation for ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2014;123(1):73-79. doi:10.1097/AOG.000000000000051
57. Jacobs I, Bast RC. The CA 125 tumour-associated antigen: A review of the literature. *Hum Reprod.* 1989;4(1):1-12. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136832

58. Jacobs I, Bridges J, Reynolds C, et al. Multimodal Approach To Screening for Ovarian Cancer. *Lancet*. 1988;331(8580):268-271. doi:10.1016/S0140-6736(88)90351-0
59. Kipps E, Tan DSP, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(4):273-282. doi:10.1038/nrc3432.Meeting
60. RUNYON BA. Care of patients with ascites. *N Engl J Med*. 1994;330(5).
61. Parsons SL, Lang MW, Steele RJC. Malignant ascites: A 2-year review from a teaching hospital. *Eur J Surg Oncol*. 1996;22(3):237-239. doi:10.1016/S0748-7983(96)80009-6
62. Ayantunde AA, Parsons SL. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: A retrospective study. *Ann Oncol*. 2007;18(5):945-949. doi:10.1093/annonc/mdl499
63. Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynecol Obstet*. 2014;121(19):3452-3454. doi:10.1002/cncr.29524
64. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol*. 2014;133(3):401-404. doi:10.1016/j.ygyno.2014.04.013
65. Al M-CK et. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science (80-)*. 2003;302(5645):643-646. doi:10.1126/science.1088759
66. Panici PB, Maggioni A, Hacker N, et al. Systematic aortic and pelvic lymphadenectomy versus resection of bulky nodes only in optimally debulked advanced ovarian cancer: A randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(8):560-566. doi:10.1093/jnci/dji102
67. Banerjee S, Kaye SB. New strategies in the treatment of ovarian cancer: Current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):961-968. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2243
68. Kossaï M, Leary A, Scoazec JY, Genestie C. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology*. 2018;85(1-2):41-49.

doi:10.1159/000479006

69. Malpica A, Deavers MT, Lu K, et al. Grading Ovarian Serous Carcinoma Using a Two-Tier System. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(4):496-504. doi:10.1097/00000478-200404000-00009
70. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov*. 2015;5(11):1137-1154. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0714
71. Malek JA, Mery E, Mahmoud YA, et al. Copy number variation analysis of matched ovarian primary tumors and peritoneal metastasis. *PLoS One*. 2011;6(12). doi:10.1371/journal.pone.0028561
72. McBride DJ, Etemadmoghadam D, Cooke SL, et al. Tandem duplication of chromosomal segments is common in ovarian and breast cancer genomes. *J Pathol*. 2012;227(4):446-455. doi:10.1002/path.4042
73. Bell D et al. Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. *Nature*. 2011. doi:10.1038/nature10166.Integrated
74. Soslow RA, Han G, Park KJ, et al. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. *Mod Pathol*. 2012;25(4):625-636. doi:10.1038/modpathol.2011.183
75. Ritterhouse LL, Nowak JA, Strickland KC, et al. Morphologic correlates of molecular alterations in extrauterine Müllerian carcinomas. *Mod Pathol*. 2016;29(8):893-903. doi:10.1038/modpathol.2016.82
76. Richard W. Tothill, Anna V. Tinker, Joshy George RB et al. Novel Molecular Subtypes of Serous and Endometrioid Ovarian Cancer Linked to Clinical Outcome. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5198-5208. doi:10.1158/1078-0432.ccr-08-0196
77. Bentink S, Haibe-Kains B, Risch T, et al. Angiogenic mRNA and microRNA gene expression signature predicts a novel subtype of serous ovarian cancer. *PLoS One*. 2012;7(2):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0030269
78. Verhaak RGW, Tamayo P, Yang JY, et al. Prognostically relevant gene

- signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Clin Invest*. 2013;123(1):517-525. doi:10.1172/JCI65833
79. Jones S, Wang TL, Kurman RJ, et al. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol*. 2012;226(3):413-420. doi:10.1002/path.3967
 80. Mayr D, Hirschmann A, Löhrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):883-887. doi:10.1016/j.ygyno.2006.05.029
 81. Farley J, Brady WE, Vathipadiekal V, et al. Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: An open-label, Single-arm, Phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14(2):134-140. doi:10.1016/S1470-2045(12)70572-7
 82. Powell CB, Swisher EM, Cass I, et al. Long term follow up of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with unsuspected neoplasia identified at risk reducing salpingo-oophorectomy. *Gynecol Oncol*. 2013;129(2):364-371. doi:10.1016/j.ygyno.2013.01.029
 83. Serov SF. Histological typing of ovarian tumours. *J Clin Pathol*. 1973;(9):1-122. <http://www.who.int/iris/handle/10665/41529>.
 84. Lee YY, Kim TJ, Kim MJ, et al. Prognosis of ovarian clear cell carcinoma compared to other histological subtypes: A meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2011;122(3):541-547. doi:10.1016/j.ygyno.2011.05.009
 85. Bamias A, Sotiropoulou M, Zagouri F, et al. Prognostic evaluation of tumour type and other histopathological characteristics in advanced epithelial ovarian cancer, treated with surgery and paclitaxel/carboplatin chemotherapy: Cell type is the most useful prognostic factor. *Eur J Cancer*. 2012;48(10):1476-1483. doi:10.1016/j.ejca.2011.09.023
 86. Gounaris I, Charnock-Jones DS, Brenton JD. Ovarian clear cell carcinoma-bad endometriosis or bad endometrium? *J Pathol*. 2011;225(2):157-160. doi:10.1002/path.2970
 87. Bounous VE, Ferrero A, Fuso L, et al. Endometriosis-associated Ovarian

- Cancer: A Distinct Clinical Entity? *Anticancer Res.* 2016;36(7):3445-3449. doi:36/7/3445 [pii]
88. Anglesio MS, Carey MS, Köbel M, MacKay H, Huntsman DG. Clear cell carcinoma of the ovary: A report from the first Ovarian Clear Cell Symposium, June 24th, 2010. *Gynecol Oncol.* 2011;121(2):407-415. doi:10.1016/j.ygyno.2011.01.005
 89. McCluggage WG. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *J Clin Pathol.* 2008;61(2):152-163. doi:10.1136/jcp.2007.049478
 90. Kimberly C. Wiegand, Sohrab P. Shah OMA-A et al. ARID1A Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas. *New Engl J Med.* 2010;363(16):1532-1543. doi:10.1371/journal.pone.0178059
 91. Al. SJ et. Frequent Mutations of Chromatin Remodeling Gene ARID1A in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Science (80-).* 2010;330(6001):228-231. doi:10.1371/journal.pone.0178059
 92. Kuo KT, Mao TL, Jones S, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1597-1601. doi:10.2353/ajpath.2009.081000
 93. Lu FI, Gilks CB, Mulligan AM, et al. Prevalence of loss of expression of DNA mismatch repair proteins in primary epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol.* 2012;31(6):524-531. doi:10.1097/PGP.0b013e31824fe2aa
 94. Geyer JT, López-García MA, Sánchez-Estevez C, et al. Pathogenetic pathways in ovarian endometrioid adenocarcinoma: A molecular study of 29 cases. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(8):1157-1163. doi:10.1097/PAS.0b013e3181a902e1
 95. Rodriguez IM, Prat J, Path FRC. Mucinous Tumors of the Ovary (of Intestinal Type) and Carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(2):139-152.
 96. Kurman RJ, Shih IM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer - Shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011;42(7):918-931. doi:10.1016/j.humpath.2011.03.003

97. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, et al. Mutational landscape of mucinous ovarian carcinoma and its neoplastic precursors. *Genome Med.* 2015;7(1):1-12. doi:10.1186/s13073-015-0210-y
98. Prat J. Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 2012;460(3):237-249. doi:10.1007/s00428-012-1203-5
99. Pignata S, Cecere SC, Du Bois A, Harter P, Heitz F. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2017;28(January):viii51-viii56. doi:10.1093/annonc/mdx441
100. Gordon C Jayson, Elise C Kohn, Henry C Kitchener JAL. Ovarian cancer. *Lancet.* 2014;384(9951):1376-1388. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7
101. Stuart GCE, Kitchener H, Bacon M, et al. 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: Report from the fourth ovarian cancer consensus conference. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21(4):750-755. doi:10.1097/IGC.0b013e31821b2568
102. Yap TA, Carden CP, Kaye SB. Beyond chemotherapy: Targeted therapies in ovarian cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):167-181. doi:10.1038/nrc2583
103. Bristow RE, Puri I, Chi DS. Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2009;112(1):265-274. doi:10.1016/j.ygyno.2008.08.033
104. Tomao F, Marchetti C, Romito A, et al. Overcoming platinum resistance in ovarian cancer treatment: from clinical practice to emerging chemical therapies. *Expert Opin Pharmacother.* 2017;18(14):1443-1455. doi:10.1080/14656566.2017.1328055
105. Rustin GJS, Marples M, Nelstrop AE, Mahmoudi M, Meyer T. Use of CA-125 to define progression of ovarian cancer in patients with persistently elevated levels. *J Clin Oncol.* 2001;19(20):4054-4057. doi:10.1200/JCO.2001.19.20.4054

106. Eisenhauer EA, Vermorken JB, Van Glabbeke M. Predictors of response to subsequent chemotherapy in platinum pretreated ovarian cancer: A multivariate analysis of 704 patients. *Ann Oncol.* 1997;8(10):963-968. doi:10.1023/A:1008240421028
107. Markman BM, Rothman R, Hakes T, et al. Second-Line Platinum Therapy in Patients With Ovarian Cancer Previously Treated With Cisplatin. *J Clin Oncol.* 1991;9(3):389-393.
108. Parmar MKB, Ledermann J a, Colombo N, et al. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet.* 2003;361:2099-2106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826431>.
109. Pfisterer J, Plante M, Vergote I, et al. Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: An intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4699-4707. doi:10.1200/JCO.2006.06.0913
110. Pujade-Lauraine E, Wagner U, Aavall-Lundqvist E, et al. Pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3323-3329. doi:10.1200/JCO.2009.25.7519
111. Lheureux S, Karakasis K, Kohn EC, Oza AM. Ovarian cancer treatment: The end of empiricism? *Cancer.* 2015;121(18):3203-3211. doi:10.1002/cncr.29481
112. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2014;32(13):1302-1308. doi:10.1200/JCO.2013.51.4489
113. Poveda AM, Selle F, Hilpert F, et al. Bevacizumab Combined With Weekly Paclitaxel, Pegylated Liposomal Doxorubicin, or Topotecan in Platinum-Resistant Recurrent Ovarian Cancer: Analysis by Chemotherapy Cohort

- of the Randomized Phase III AURELIA Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(32):3836-3838. doi:10.1200/jco.2015.63.1408
114. Sebastian Vaughan, Jermaine I. Coward, Robert C. Bast Jr et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:719-725. doi:10.1038/nmiddleeast.2012.29
 115. Gibson. Updates on drug discovery in ovarian cancer. *Gynecol Oncol Res Pract*. 2014;1(3):1-7. doi:10.4172/2167-7700.100109
 116. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer : a phase 2 , multicentre , open-label , non-randomised study. *Lancet Oncol*. 2011;12(9):852-861. doi:10.1016/S1470-2045(11)70214-5
 117. Kaufman B, Shapira- R et al. Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation. *J Clin Oncol*. 2015;33(3). doi:10.1200/JCO.2014.56.2728
 118. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, et al. Rucaparib in relapsed , platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international , multicentre , open-label , phase 2 trial. *Lancet*. 2017;18(1):75-87. doi:10.1016/S1470-2045(16)30559-9
 119. Jonathan Ledermann, Philipp Harter, Gourley Charlie MF. Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *new engl J o f Med*. 2012;366:1382-1392.
 120. Geoffrey Kim, Gwynn Ison, Amy E. McKee, Hui Zhang, Shenghui Tang TG et al. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy Geoffrey. *Am Assoc cancer*. 2015. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0887
 121. Damia G, Broggini M. Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):119. doi:10.3390/cancers11010119
 122. Abcam. Flow cytometry intracellular staining protocol.

https://docs.abcam.com/pdf/protocols/Flow_cytometry_intracellular-staining_protocol.pdf. Accessed July 5, 2019.

123. Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429. doi:10.4103/1947-2714.100998