

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ
ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ (VEGF) ΣΤΟΥΣ
ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΩΘΟΗΚΩΝ»

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Χ. ΖΙΩΓΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μελέτιος Αθανάσιος Δημόπουλος, Καθηγητής Θεραπευτικής
Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Αλέξανδρος Ροδολάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ά Μαιευτικής και
Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Αριστοτέλης Μπάμιας, Αναπληρωτής Καθηγητής Θεραπευτικής Κλινικής
Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον καθηγητή κύριο Μ.Α.Κ. Δημόπουλο για την εν γένει υποστήριξη που μου παρέσχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Μπάμια Αριστοτέλη, αναπληρωτή καθηγητή, ο οποίος είχε και την επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής και καθ' όλη την διάρκεια της έρευνας, της συλλογής των στοιχείων, της επεξεργασία τους, την ανάλυση και την δημοσίευση των ευρημάτων, υπήρξε σθεναρός συμπαραστάτης και αρωγός σε κάθε πρόβλημα που αντιμετώπισα. Βοήθησε αποφασιστικά με τις γνώσεις του και την προθυμία του στην ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους κυρίους Μαρίνο Τσιατά, παθολόγο ογκολόγο και Νικόλαο Γαβαλά, βιοχημικό για την αμέριστη βοήθεια που προσέφεραν καθ' όλη την διάρκεια της έρευνας τόσο στο εργαστηριακό όσο και στο συγγραφικό μέρος της διατριβής μου.

Τέλος, εκ βάθους καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την βιοχημικό κυρία Χριστίνα Λιάκου που μου προσέφερε πάντοτε με προθυμία εκπαίδευση πάνω και στις εργαστηριακές τεχνικές καθώς και υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού μου. Με θέρμη και υπομονή αντιμετώπισε κάθε δυσκολία που είχα κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών. Είναι αλήθεια πως προσφέρει πάντοτε στοργικές συμβουλές σε όλους τους επιστήμονες που χρησιμοποιούν κατά την διάρκεια της έρευνας τους το εργαστήριο της Αιματολογικής και Ογκολογικής Μονάδας του ΕΚΠΑ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Ζιώγας Απόστολος

Όνομα πατρός: Χρήστος.

Ημερομηνία γεννήσεως: 02/07/1983.

Τόπος γεννήσεως: Λάρισα.

Διεύθυνση Κατοικίας: Πραξιτέλους 3, Λάρισα, ΤΚ 41221.

Τηλέφωνο: 2410-288074, 6932342269.

E-mail: aziogas@med.uoa.gr, ziogasapo@hotmail.com

Στρατιωτική θητεία: Πολεμική Αεροπορία (11/11/2008-11/11/2009)

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμος.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Μέση εκπαίδευση

1995-2001. Μέση εκπαίδευση: 2^ο Γυμνάσιο Λάρισας, Λάρισα.

2^ο Γενικό Λύκειο Λάρισας, Λάρισα.

(Βαθμός Απολυτηρίου: 19.9, «Άριστα»)

Πανεπιστημιακή Εκπαίδευση

2001-2007. Εισαγωγή κατόπιν πανελληνίων εξετάσεων και φοίτηση στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών.

(Βαθμός πτυχίου: 7,92 «Λίαν Καλώς»)

Μεταπτυχιακή Εκπαίδευση

2011-2012. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα σπουδών του ΠΜΣ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας << Η Βιολογία της αναπαραγωγής >>.

(Βαθμός πτυχίου: 8,53 «Άριστα»)

2008- Σήμερα Υποψήφιος Διδάκτωρ, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ε.Κ.Π.Α.

Θέμα: <<Επίδραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) στους υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων στον καρκίνο ωοθηκών>>.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

06/2008-11/2008	Επιστημονικός συνεργάτης της Ελληνικής Συνεργαζόμενης Ογκολογικής Ομάδας.(HECOG).
01/2009-11/2009	Υγειονομικός ιατρός- ειδικευόμενος βοηθός της Β Χειρουργικής Κλινικής του 251 ΓΝΑ.
12/2009-12/2010	Ειδικευόμενος βοηθός της Χειρουργικής Κλινικής του Γ.Ν. Σάμου «Ο Άγιος Παντελεήμων».
3/2011-10/2012	Υπηρεσία υπαίθρου στο Κ.Υ. Γόννων Ν. Λάρισας.

Παρούσα Θέση

10/2012- Σήμερα Ειδικευόμενος βοηθός της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν. Λάρισας.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθήνας (Λίαν καλώς-2007).

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Σπουδών του ΠΜΣ <<Βιολογία της Αναπαραγωγής>>
(Άριστα-2012)

Τμητικό Δίπλωμα της Ένωσης Ελλήνων Χημικών. Έπαινος στον 15^ο Πανελλήνιο
Μαθητικό Διαγωνισμό Χημείας το έτος 200-2001.

Πιστοποιητικό επιτυχίας στο ATLS course 2/2008.

Πιστοποιητικό επιτυχίας στο ALSO course 11/2011.

Πιστοποιητικό επιτυχίας στο ALSG course 11/2012.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

Ιατρικός Σύλλογος Λάρισας

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Certificate of Proficiency, University Of Michigan

Γαλλικά :Delf 1-(A₁₋₄)

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Marinos Tsiatas, Reveka Gyftaki, Christina Liakos, **Apostolos Ziogas** Meletios A. Dimopoulos, Aristotelis Bamias. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) IS ASSOCIATED WITH REDUCED NK-like T CELLS IN ASCITES AND SUPPRESSES LYMPHOCYTES IN CELL CULTURES: PROGNOSTIC IMPLICATIONS OF VEGF IN ASCITES FROM OVARIAN CANCER..ESMO 2008.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Λεβίδου Γεωργία, Κορκολιοπούλου Πηνελόπη, Νικητέας Νικόλαος, Τζανάκης Νικόλαος, Θυμάρα Ειρήνη, Σαέττα Αγγελική, Τσιγρής Χρήστος, Ράλλης Γεώργιος, **Ζιώγας Απόστολος**, Αρβανίτης Μ., Γιαννόπουλος Γεώργιος, Πέρος Γεώργιος, Πατσούρης Ευστράτιος. Έκφραση του NFκ-B στον καρκίνο του στομάχου. Συσχέτιση με την πρωτεΐνη ΙΚΒΑ και την πρόγνωση. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο & International Forum του Ελληνικού Κολλεγίου Χειρουργών. 26-28/4/2007 Αθήνα.

2. Τσιατάς Μ., Γυφτάκη Ρ., **Ζιώγας Α.**, Λιάκου Χ., Δημόπουλος Μ., Μπάμιας Α. Η προγνωστική αξία του VEGF στον καρκίνο ωοθηκών. Πιθανόν σχετίζεται με αναστολή πολλαπλασιασμού των NK-LIKE-T λεμφοκυττάρων μέσω αντίστοιχων υποδοχέων. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας. 8-10/5/2008 Αθήνα.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor type 2.

Ziogas AC, Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, Politi E, Terpos E, Rodolakis A, Vlahos G, Thomakos N, Haidopoulos D, Antsaklis A, Dimopoulos MA, Bamias A.

Dept of Clinical Therapeutics, Medical School, University of Athens. Int J Cancer. 2012 Feb 15;130(4):857-64. doi: 10.1002/ijc.26094. Epub 2011 May 25.

2. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2.

Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, Politi E, Ioannou K, Ziogas AC, Rodolakis A, Vlahos G, Thomakos N, Haidopoulos D, Terpos E, Antsaklis A, Dimopoulos MA, Bamias A.

Dept of Clinical Therapeutics, Medical School, University of Athens. Br J Cancer. 2012 Nov 20;107(11):1869-75. doi: 10.1038/bjc.2012.468.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ΩΟΘΗΚΗ

Στοιχεία εμβρυολογίας γεννητικού συστήματος	12
Εμβρυολογία ωοθήκης	18
Ανατομία Ωοθήκης	20

2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ιστογενετική Ταξινόμηση	15
Παθογένεση	28
Επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών	31
Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου	31
Ιστολογία	35
Συμπτώματα	39
Διάγνωση	40
Φυσική εξέταση	41
Απεικονιστική αξιολόγηση	43
Εργαστηριακή αξιολόγηση	45
Τρόποι επέκτασης	47
Σταδιοποίηση	48
Θεραπευτική Αντιμετώπιση	52
Πρόγνωση	61

3. ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Ταξινόμηση	66
Υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα	68
Παραγωγή και φυσιολογική δράση του VEGF	71

4. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΝΕΣΗ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ

Αγγειογένεση του όγκου	73
Ο ρόλος του VEGF	75
Θεραπευτικός στόχος στα κακοήθη νεοπλάσματα	77

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

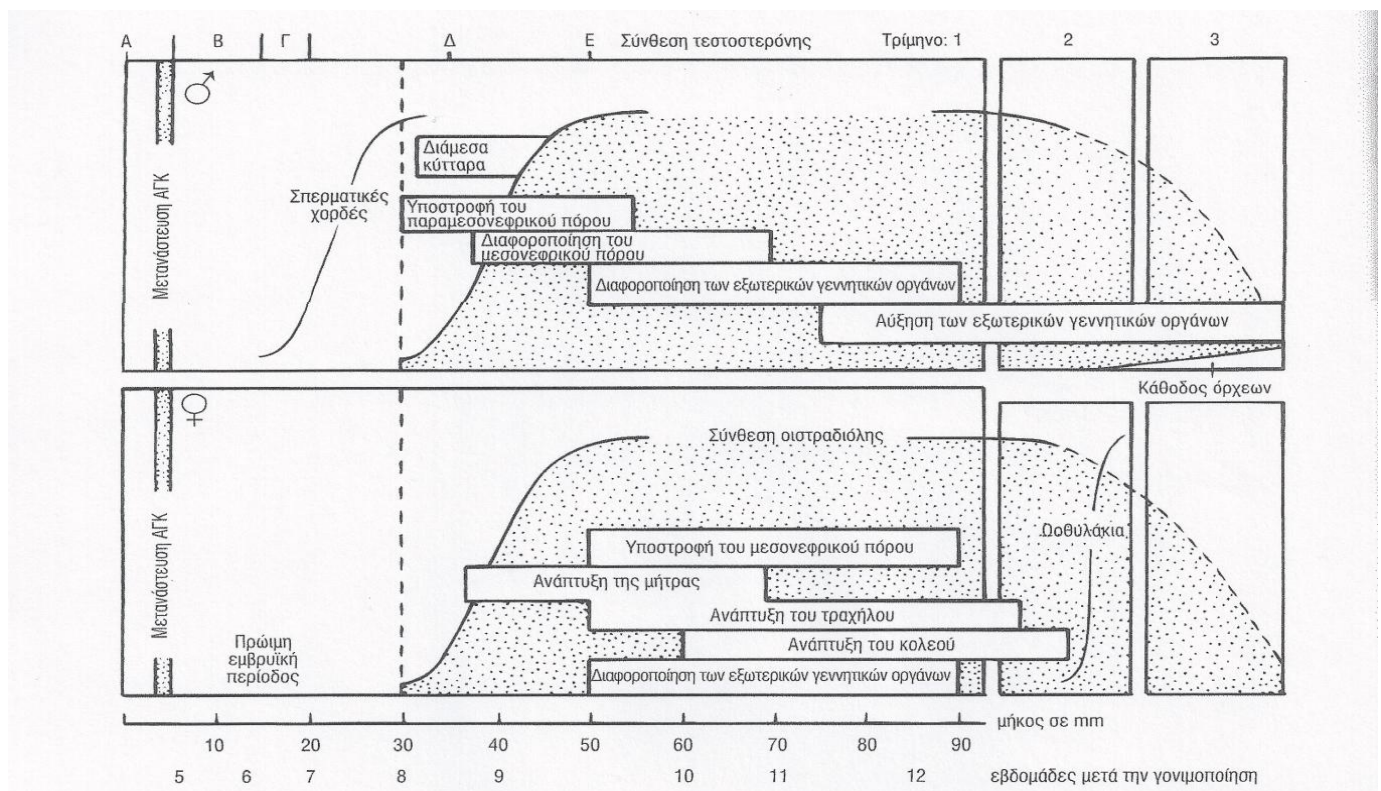
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ	81
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	83
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
Α) ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ VEGF ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.	97
Β) ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ VEGF ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΣΚΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ.	105
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	113
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	119
<u>PUBLICATIONS</u>	128
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	130

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ΩΟΘΗΚΗ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι γνώσεις της εμβρυολογίας του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την κατανόηση της παθογένεσης και της εξέλιξης των όγκων αυτού του συστήματος. Το γεννητικό σύστημα αποτελείται από τους γεννητικούς αδένες (γονάδες), ένα σύστημα πόρων και τα έξω γεννητικά όργανα. Από τα διάφορα στοιχεία της φυλετικής διαφοροποίησης, μερικά εμφανίζονται κατά την πρώιμη εμβρυϊκή περίοδο, άλλα κατά την όψιμη εμβρυϊκή περίοδο και μερικά μεταγεννητικά, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Η προγεννητική ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος ως προς το μήκος και την ηλικία του πρώιμου / όψιμου εμβρύου (1). Διακρίνονται οι ακόλουθες περιόδους: **A.** χρωμοσωματικό φύλο, **B.** φάση αδιαφοροποίητου γεννητικού αδένα, **Γ.** διαφοροποίηση γεννητικού αδένα., **Δ.** διαφοροποίηση των πόρων, **Ε.** διαφοροποίηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων. **ΑΓΚ:** αρχέγονα γεννητικά κύτταρα.

Η διαφοροποίηση του φύλου στο πρώιμο έμβρυο εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και από ορμονικούς παράγοντες.

Οι γενετικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα και συγκεκριμένα τα φυλετικά. Για τις πρώτες 7 εβδομάδες η ανάπτυξη των δυο φύλων είναι ακριβώς ίδια. Από την χρονική αυτή στιγμή αρχίζει η διαφοροποίηση των γονάδων προς όρχι ή ωοθήκη που θα χαρακτηρίσει το γοναδικό φύλο. Η διαφοροποίηση αυτή εξαρτάται από την παρουσία του Y χρωμοσώματος. Συγκεκριμένα το γονίδιο που καθορίζει τη δημιουργία του όρχεος (SRY) βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του Y χρωμοσώματος. Ωστόσο, συμμετοχή και των δύο χρωμοσωμάτων είναι σημαντική με την έννοια ότι η διαφοροποίηση καθορίζεται από ειδικές πρωτεΐνες της επιφάνειας των κυττάρων όπως το αντιγόνο H-Y, παράγωγο γονιδίου του Y χρωμοσώματος αλλά και άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες προκύπτουν από τα αυτοσωματικά χρωμοσώματα. Η ρύθμιση της παραγωγής των πρωτεϊνών αυτών καθορίζεται θετικά από επιτόπους στο Y χρωμόσωμα και αρνητικά από επιτόπους στο X χρωμόσωμα.

Ο φαινότυπος ενός ατόμου εξαρτάται από την επίδραση ή όχι των ανδρογόνων. Εάν δεν υπάρχει ανδρογονική δράση είτε διότι οι γονάδες είναι ωοθήκες είτε διότι τα ανδρογόνα για διάφορους λόγους αδυνατούν να δράσουν στους περιφερικούς ιστούς, τότε η διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων θα γίνει προς την κατεύθυνση του θήλεος. Σε ότι αφορά στα έσω γεννητικά όργανα η διαφοροποίηση εξαρτάται από την παρουσία ή όχι όρχεως μέσω μιας ειδικής ουσίας που παράγουν, τον αναστολέα των πόρων του Muller. (AMH). Η ουσία αυτή ως προς την δράση της εξαρτάται από τη θέση παραγωγής της, δηλαδή εάν ο ένας όρχις απουσιάζει τότε στην πλευρά αυτή θα αναπτυχθεί ο πόρος του Muller με το σχηματισμό της σάλπιγγος και της μήτρας και στην άλλη ο πόρος του Wolf.

Η φυλετική διαφοροποίηση μπορεί να αναλυθεί σε διάφορες φάσεις:

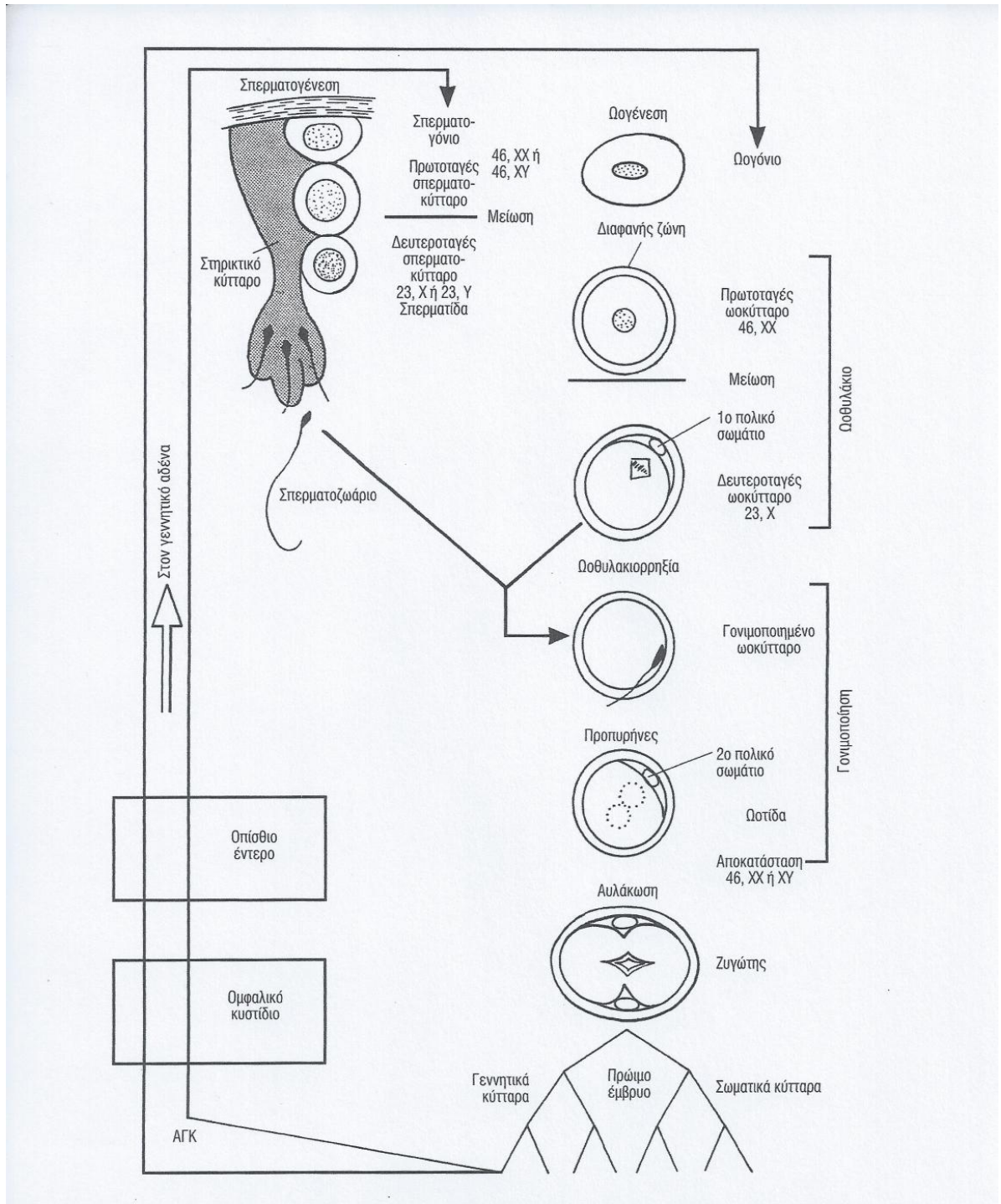
A) Το γενετικό φύλο (genetic sex) διαπιστώνεται από την ύπαρξη φυλετικής χρωματίνης (χρωμοσωματικό φύλο/ chromosomal sex) στους πυρήνες των θηλέων κυττάρων, πρώτα εξωεμβρυϊκώς και ύστερα μέσα στον εμβρυϊκό δίσκο.

B) Το γοναδικό φύλο (gonadal sex) (καθοριζόμενο από το χρωμόσωμα Y) αναφέρεται στις ιστολογικές διαφορές που εμφανίζονται στο άρρεν πρώιμο έμβρυο στις 6 εβδομάδες και στο θήλυ στις 7 εβδομάδες.

Γ) Το φαινοτυπικό ή σωματικό φύλο (phenotypical ή somatic sex) δημιουργείται με την φυλετική διαφοροποίηση του συστήματος των πόρων και των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, η οποία αρχίζει νωρίς κατά την όψιμη εμβρυϊκή περίοδο (1ο τρίμηνο).

Δ) Αργότερα προεξάρχουν άλλες όψεις: το απονεμόμενο φύλο (assigned sex), κατά την γέννηση, και το υιοθετούμενο φύλο (adopted sex) (συνήθως το ίδιο με το απονεμόμενο φύλο) μεταγεννητικά.

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (ΑΓΚ) διαφοροποιούνται νωρίς, αλλά είναι άγνωστο πότε και από πού ακριβώς. Παράγονται εξωγοναδικώς από το ενδόδερμα, αλλά πιθανώς εμμέσως από την επιβλάστη. Πιστεύεται, ωστόσο, ότι (στον μυ) τα πρώιμα βλαστομερίδια είναι ικανά να παράγουν και σωματικά και γεννητικά κύτταρα, και ότι στα θηλαστικά μπορεί να μην υπάρχει μια συνεχής γενεαλογική σειρά γεννητικών κυττάρων. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα ανιχνεύονται σαφώς κατ' αρχάς στο τοίχωμα του ομφαλικού κυστιδίου από όπου, με διάφορες ενεργητικές και παθητικές κινήσεις, χίλια περίπου κύτταρα μεταναστεύουν στους γεννητικούς αδένες. Είναι δυνατόν να ανιχνευθούν διαδοχικά στο οπίσθιο έντερο, στις μεσονεφρικές ταινίες και στις γεννητικές ταινίες (EIKONA 2). Τα γεννητικά κύτταρα που δεν φθάνουν στους γεννητικούς αδένες συνήθως εξαφανίζονται, αλλά μπορεί να δημιουργήσουν τερατώματα.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Η γαμετογένεση και η γονιμοποίηση σχηματικά (1) .

Ο ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΑΔΕΝΑΣ

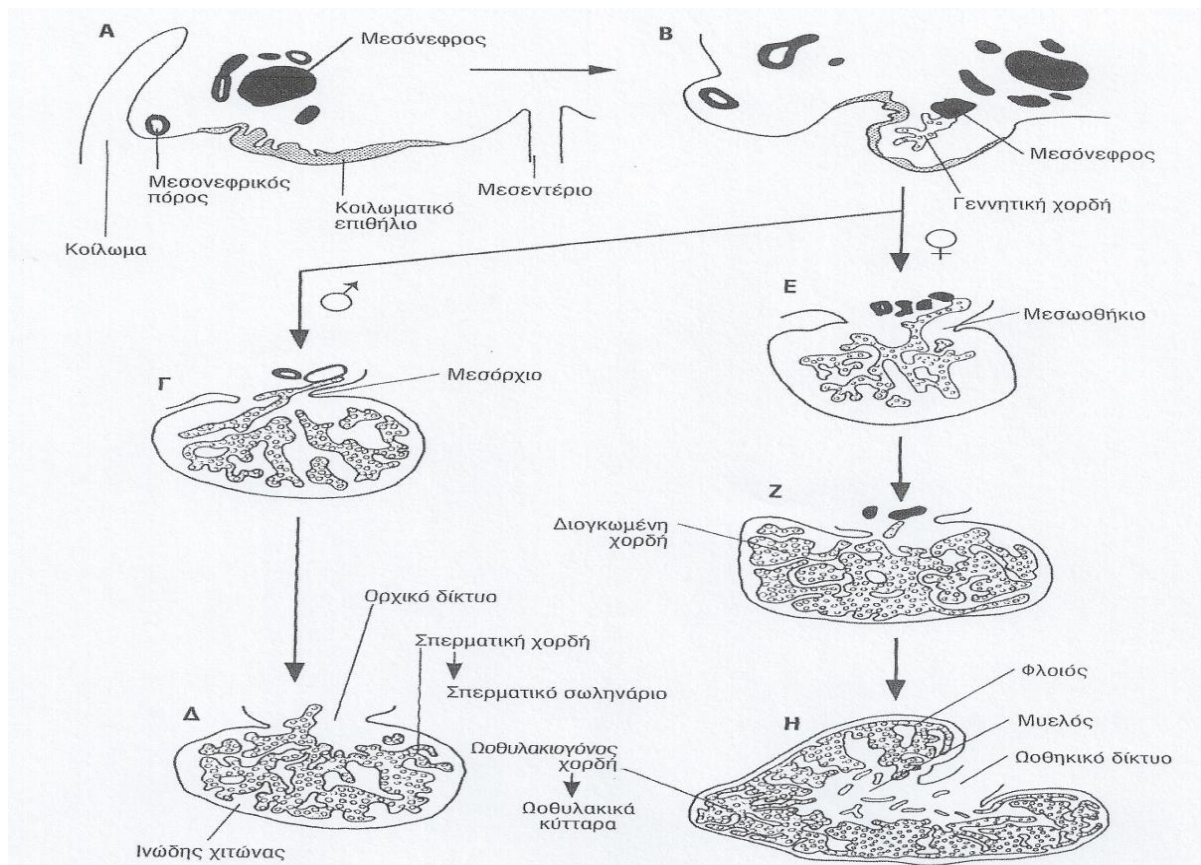
Δεν υπάρχει ακόμη συμφωνία όσον αφορά ορισμένες λεπτομέρειες για την ανάπτυξη των γεννητικών αδένων. Ο γεννητικός αδένας χαρακτηρίζεται ως αδιαφοροποίητος έως ότου αναγνωρισθεί ως όρχις ή ωοθήκη (2). Η περίοδος που ο γεννητικός αδένας περιγράφεται ως αδιαφοροποίητος είναι από 4,5 έως 6 εβδομάδες του εμβρύου.

Ο όρος αδιαφοροποίητος σημαίνει ότι ο γεννητικός αδένας δεν διακρίνεται ιστολογικά ως άρρεν ή θήλυς. Μια πάχυνση του κοιλωματικού επιθήλιου υπέρκειται ενός μεσοδερματικού βλαστήματος που ονομάζεται γεννητική ταινία (genital ridge) στην έσω κοιλιακή όψη του μεσονέφρου. Πιστεύεται ότι τα μεσονεφρικά κύτταρα επάγουν τον σχηματισμό της γοναδικής καταβολής. Αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εισδύουν στο κοιλωματικό επιθήλιο των γεννητικών ταινιών, και η πρόσκαιρη απώλεια του βασικού υμένα επιτρέπει στο επιθήλιο να συμβάλλει στο γοναδικό βλάστημα. Φλοιός και μυελός δεν διακρίνονται ακόμη. Εν συνεχεία αναπτύσσονται κυτταρικές πλάκες που γίνονται κυλινδρικές χορδές και περιέχουν γεννητικά και σωματικά κύτταρα. Ο γεννητικός αδένας περιέχει αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και διάφορα είδη σωματικών κυττάρων.

Η προέλευση των σωματικών κυττάρων είναι αδιευκρίνιστη, αλλά μπορεί να προέρχονται από μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες πηγές: (1) κύτταρα μεσονεφρικής καταγωγής, (2) το τοπικό μεσέγχυμα και (3) το επιπολής (κοιλωματικό) επιθήλιο της γεννητικής ταινίας, που αυτό καθ' εαυτό δεν είναι «βλαστικό επιθήλιο», όπως θεωρείτο παλαιότερα. Το κοιλωματικό επιθήλιο και οι κοιλωματικές χορδές που παράγονται από αυτό, ωστόσο, μπορεί να δρουν κυρίως ως υποστύλωμα. Σήμερα υποστηρίζεται ότι τα κύρια κύτταρα του γεννητικού αδένου προέρχονται από τον μεσόνεφρο (Sato) που δημιουργεί τις γεννητικές χορδές καθώς και τα στηρικτικά και τα διάμεσα κύτταρα. Στην παραγωγή των διάμεσων κυττάρων μπορεί να μετέχει το μεσέγχυμα. Η εγκατάσταση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στις γεννητικές ταινίες, που γίνεται ανεξαρτήτως του SRY, είναι αναγκαία για την γονιμότητα, όχι όμως και για την ορχική διαφοροποίηση και λειτουργικότητα. Οι ωοθήκες, ωστόσο, όταν δεν γίνει εγκατάσταση, σχηματίζουν ραβδωτούς γεννητικούς αδένες που δεν παράγουν φυλετικά στεροειδή κατά την ήβη. Καθώς ο γεννητικός

αδένας αναπτύσσεται και διαχωρίζεται περισσότερο από την μεσонеφρική ταινία, στην περιοχή της μελλοντικής πύλης σχηματίζεται ένα «μεσεντέριο», το μεσόρχιο (mesorchium) ή μεσωοθήκιο (mesovarium). Αργότερα, το μεσωοθήκιο παρέχει την πρόσφυση της ωοθήκης στον πλατύ σύνδεσμο της μήτρας.

Μεταξύ 6 και 7 εβδομάδων, οι μορφολογικά αδιαφοροποίητοι γεννητικοί αδένες αρχίζουν να γίνονται είτε όρχεις είτε ωοθήκες (ΕΙΚΟΝΑ 3). Αυτές οι δύο ασύμμετρες οδοί γοναδικής ανάπτυξης, αν και συγκρίσιμες, προκύπτουν κατά διαφορετικό τρόπο. Η διαφοροποίηση σε ωοθήκες αποτελεί κατ' αρχάς παθητική συνέχεια της φάσης του αδιαφοροποίητου αδένου, ενώ η διαφοροποίηση σε όρχεις είναι ενεργητική διεργασία εξαρτώμενη από ορισμένους παράγοντες.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Ανάπτυξη γεννητικού αδένου (1).

Εμβρυολογία Ωοθήκης

Σύμφωνα με την θεωρία της ασύμμετρης ανάπτυξης των γεννητικών αδένων, ο γενετικά καθορισμένος θήλυς γεννητικός αδένας συνεχίζει την φάση του αδιαφοροποίητου αδένα αυξανόμενος περαιτέρω μέχρι τον σχηματισμό ωοθυλακίων. Πιστεύεται ότι η ωοθήκη είναι δυνατόν να αναγνωρισθεί στις 7 εβδομάδες, αρχικά απλώς από την απουσία ορχικών χορδών. Με άλλα λόγια, η αρχική ανάπτυξη της ωοθήκης φαίνεται σαν προέκταση της φάσης του αδιαφοροποίητου αδένα. Τα κύτταρα του βλαστήματος προέρχονται από τον μεσόνεφρο και ίσως από το μεσέγχυμα, ενώ η συμβολή του επιθηλίου του κοιλώματος αμφισβητείται. Οι γεννητικές χορδές μετατοπίζονται στην περιφέρεια, καθώς αναπτύσσεται ο μυελός, και διαφοροποιούνται προς ωοθυλακιογόνους χορδές (Sato) που παράγουν τα ωοθυλακικά κύτταρα. Στην ωοθήκη, ο φλοιός (cortex) αναπτύσσεται προς το τέλος της πρώιμης εμβρυϊκής περιόδου και περιλαμβάνει μια αναδιάταξη μέσα στο αρχέγονο γοναδικό βλάστημα. Ο φλοιός περιέχει πολλά γεννητικά κύτταρα. Αυξάνεται με την προσθήκη σκοτεινών (μεσονεφρικών) κυττάρων που μεταναστεύουν προς την περιφέρεια, και διαυγών (ίσως κοιλωματικών) κυττάρων που κατευθύνονται προς το κέντρο. Πιστεύεται ότι ο μυελός (medulla) σχηματίζεται από έναν πυκνό κεντρικό πυρήνα κυττάρων και από το βλάστημα του ωοθηκικού δικτύου. Οι μυελικές χορδές (medullary cords) είναι δυνατόν να διακριθούν στην ωοθήκη περί το τέλος της πρώιμης εμβρυϊκής περιόδου. Κανονικά, δεν αναπτύσσουν αυλό και εξαφανίζονται κατά το 3ο τρίμηνο. Πιστεύεται ότι, όπως και στον όρχι, το κεντρικό γοναδικό βλάστημα είναι δεξαμενή παροχής σωματικών κυττάρων στον γεννητικό αδένα.

Μολονότι το ωοθηκικό δίκτυο, αποτελούμενο από σωληνάκια, είναι δυνατόν να βρεθεί κατά το μέσον της κύησης, δεν είναι καλά ανεπτυγμένο και κανονικά δεν επικοινωνεί με τα μεσονεφρικά σωληνάκια. Συνεπώς, ο μεσονεφρικός πόρος δεν χρησιμοποιείται στην γεννητική οδό του θήλεος, και τα ωοθυλάκια με ώριμα ωοκύτταρα πρέπει να διαρρήξουν την επιφάνεια της ωοθήκης.

Κατά το 2ο τρίμηνο παρατηρείται στην ωοθήκη ένας ινώδης χιτώνας, δηλαδή μια υποεπιθηλιακή συνδετική στιβάδα. Βρίσκεται εσωτερικά του βασικού υμένα και αποτελείται από κολλαγόνους ίνες και ινοβλάστες.

Τα κύρια κύτταρα που ανευρίσκονται στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη είναι τα γεννητικά, τα στηρικτικά και τα διάμεσα.

Ωογέννεση και ωοθυλακιογένεση.

Στην αρχή της όψιμης εμβρυϊκής περιόδου τα ωογόνια πληθύνονται ταχέως με μιτωτικές διαιρέσεις και παρέχουν πρωτοταγή ωοκύτταρα, διεργασία που ονομάζεται ωογένεση. Προς το τέλος του 1ου τριμήνου τα κύτταρα αυτά εισέρχονται στην πρόφαση της 1ης μειωτικής διαίρεσης, στην οποία μερικά μπορεί να παραμείνουν έως 40 έτη. Ο αριθμός των ωοκυττάρων στην φάση της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας και της διπλοταινίας αυξάνεται βαθμιαία. Ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων φθάνει σε ένα μέγιστο (7 περίπου εκατομμύρια) στις 20 εβδομάδες και κατόπιν μειώνεται, λόγω διακοπής των μιτωτικών διαιρέσεων και εκφύλισης μέρους των γεννητικών κυττάρων. Κατά την γέννηση παραμένουν δύο περίπου εκατομμύρια, από τα οποία τα μισά εμφανίζουν σημεία ατρησίας.

Υποστηρίζεται συνήθως ότι ο τελικός αριθμός των πρωτοταγών ωοκυττάρων δεν αυξάνεται πέραν του αρχικού αριθμού τους κατά τον σχηματισμό της ωοθήκης, δηλαδή το απόθεμα των ωοκυττάρων είναι καθορισμένο. Η ωογένεση παύει γενικώς κατά το 3ο τρίμηνο. Στο μέσον περίπου της κύησης, τα ωοκύτταρα στην φάση της διπλοταινίας περιβάλλονται από αποπλατυσμένα σωματικά κύτταρα, τα ωοθυλακικά κύτταρα ή κύτταρα του κοκκώδους υμένα (follicular ή granulosa cells), τα οποία πιθανώς προέρχονται από το ωοθηκικό δίκτυο και το κοιλωματικό επιθήλιο. Πιστεύεται ότι ως προς τα γεννητικά κύτταρα, τα ωοθυλακικά κύτταρα είναι δύο τύπων: τα κύτταρα του πρώτου τύπου παρεμποδίζουν την μείωση, ενώ τα κύτταρα του δεύτερου τύπου την επάγουν. Κάθε πρωτοταγές ωοκύτταρο μαζί με τα αποπλατυσμένα κύτταρα που το περιβάλλουν αποτελεί ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο (primordial ovarian follicle). Κατά τον χρόνο της γέννησης, ο φλοιός της ωοθήκης είναι γεμάτος με αρχέγονα ωοθυλάκια, πολλά από τα οποία υφίστανται ατρησία. Η εμφάνιση δευτεροταγών ωοκυττάρων και ωριμότερων ωοθυλακίων διαφόρων

φάσεων καθυστερεί μέχρι την ήβη. Το ωοθυλάκιο είναι το ισοδύναμο της ορχικής χορδής, με την έννοια ότι και τα δύο περιβάλλουν γεννητικά κύτταρα και τα διαχωρίζουν από το περιβάλλον τους.

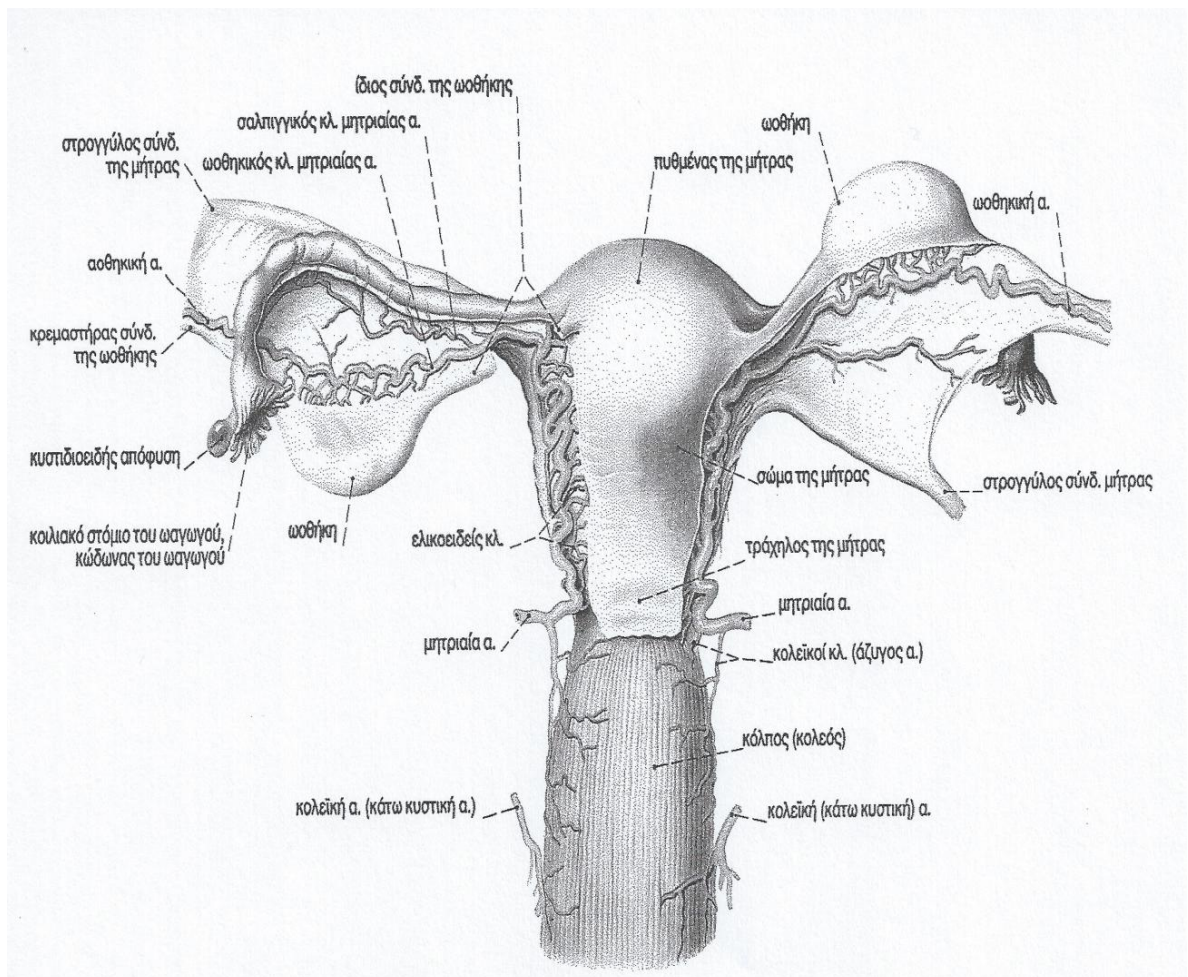
Ανατομία Ωοθήκης.

Οι δύο γυναικείες γονάδες ονομάζονται ωοθήκες και διαπλάσσονται αρχικά δεξιά και αριστερά από την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (ύψος Θ10 σπονδύλου) (3). Από τον 3^ο εμβρυϊκό μήνα κατέρχονται προς την ελλάσωνα πύελο, όπου με την εμφάνιση της ήβης μένουν μόνιμα. Μετά το 15^ο έτος ηλικίας κάθε ωοθήκη βρίσκεται τοποθετημένη στην ελλάσωνα πύελο, αντίστοιχα προς τον έσω θυρεοειδή μυ, στο ωοθηκικό βοθρίο. Το έδαφος του βοθρίου, σχηματίζεται από την περιτονία του ψοίτη μυός, κεντρικά αφορίζεται από την αποφραχθείσα ομφαλική αρτηρία και περιφερικά από τον ουρητήρα και την έσω λαγόνιο αρτηρία. Ο ωοθηκικός βόθρος αντιστοιχεί στο ύψος της άνω λαγόνιας άκανθας και στη θέση αυτή κρέμεται η ωοθήκη από το οπίσθιο πέταλο του πλατέος συνδέσμου με ιδιαίτερη περιτοναϊκή πτυχή το μεσοωοθήκιο.

Μορφολογία-Σχέσεις

Οι ωοθήκες, έχουν σχήμα αμυγδαλοειδές, μήκος 3 εκ., πλάτος 1,5 εκ., και πάχος περί το 1 εκ (4). Αναγνωρίζονται ο άνω πόλος και ο κάτω πόλος της ωοθήκης. Η επιφάνεια της ωοθήκης, είναι λεία κατά την γέννηση του κοριτσιού, έως την ήβη. Αργότερα παρατηρούνται διάφορα οζίδια και ουλές, συνέπεια ωρίμανσης και ωοθυλακιορρηξιών. Το σχήμα της είναι ελλειψοειδές και εμφανίζει δυο χείλη, το πρόσθιο και το οπίσθιο, δυο άκρα ή πόλους, το άνω και το κάτω και δυο επιφάνειες, την έξω και την έσω. Το πρόσθιο χείλος (προσφυόμενο) έρχεται σε σχέση με τη λήκυθο του ωαγωγού και ονομάζεται και πυλαίο χείλος, γιατί από αυτό εισέρχονται τα αγγεία και τα νεύρα της ωοθήκης. Κατά μήκος του χείλους αυτού προσφύεται το μεσοωοθήκιο, με το οποίο η ωοθήκη συνδέεται με τον πλατύ σύνδεσμο. Το οπίσθιο

χείλος (ελεύθερο) έρχεται σε σχέση με τον κώδωνα του ωαγωγού, τον ουρητήρα και την μητριάια αρτηρία. Από τα άκρα της ωθήκης στο άνω προσφύεται ο κρεμαστήρας σύνδεσμος της ωθήκης και στο κάτω, το οποίο απέχει περίπου 2 εκ. από το πυελικό έδαφος, προσφύεται ο ίδιος σύνδεσμός της ωθήκης. Η έξω επιφάνεια της ωθήκης έρχεται σε άμεση σχέση με το περιτόναιο του πυθμένα του ωθηκικού βόθρου και έμμεσα με τα καλυπτόμενα από το περιτόναιο μόρια, τον έσω θυροειδή μυ, τα θυροειδή αγγεία και το θυροειδές νεύρο. Η έσω επιφάνεια καλύπτεται από τον κώδωνα του ωαγωγού και από το μεσοσαλίγγιο.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα (5).

Στήριξη

Εξασφαλίζεται με το μεσοωοθήκιο, τον κρεμαστήρα σύνδεσμο και τον ίδιο σύνδεσμο της ωοθήκης. Από τον άνω πόλο της ωοθήκης, ή σαλπγγικό, ο κρεμαστήρας σύνδεσμος καταλήγει στην περιτονία του ψοΐτη μυός και περιέχει τα ωοθηκικά αγγεία και νεύρα. Αυτός ο πόλος, έρχεται σε επαφή με τον κώδωνα και τους κροσσούς της αντίστοιχης σάλπιγγας. Ο κάτω πόλος της ωοθήκης ή μητρικός, συνδέεται με το κέρασ της μήτρας με τον ίδιο σύνδεσμο της ωοθήκης ή μητροωοθηκικό, που σχηματίζεται από την αναδίπλωση του πλατέως συνδέσμου. Το πρόσθιο πέταλο του πλατέως συνδέσμου, καταλήγει στην σύστοιχη σάλπιγγα ως μεσοωοθήκιο.

Κατασκευή

Στη δομή της ωοθήκης, αναγνωρίζουμε την φλοιώδη μοίρα και την μυελώδη μοίρα. Η φλοιώδης μοίρα που εξωτερικά καλύπτει την ωοθήκη αποτελείται από μονόστιβο κυβοειδές επιθήλιο που είναι το βλαστικό επιθήλιο, το οποίο μετά την πάροδο της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας αποπλατύνεται. Μέσα στο συνδετικό στρώμα αυτής, παρατηρούνται πολλαπλά ωοθυλάκια, ανάλογα με την αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας: αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή ωοθυλάκια, ώριμα ωοθυλάκια, ωχρά σωμάτια και λευκά σωμάτια. Η μυελώδης μοίρα, στο κέντρο του αδένα, αποτελείται από συνδετικό ιστό, λείες μυϊκές ίνες, αγγεία, νεύρα και από επιθηλιακά λείψανα της καταβολής της ωοθήκης, τις μυελώδεις δοκίδες. Το συνδετικό στρώμα της ωοθήκης, δηλαδή της φλοιώδους και μυελώδους ουσίας της αποτελείται από συνδετικό ιστό, από ατρακτοειδή κύτταρα (όμοια με του ήπατος) και από διάμεσα κύτταρα (αντιστοιχούντα στα διάμεσα κύτταρα του όρχεος). Το ανατομικό σημείο από το οποίο εισέρχονται τα νεύρα, οι αρτηρίες και οι φλέβες στην ωοθήκη ονομάζεται πύλη.

Αγγεία – Λεμφαγγεία – Νεύρα

Η αιμάτωση της ωοθήκης προέρχεται από τις ωοθηκικές αρτηρίες, που είναι κλάδοι της κοιλιακής αορτής καθώς και από κλάδους της μητριάας αρτηρίας. Αριστερά, σπανιότερα, η ωοθηκική αρτηρία είναι κλάδος της αριστεράς νεφρικής αρτηρίας. Οι φλέβες, αφού αναστομωθούν με τις παρακείμενες φλέβες της μήτρας, σχηματίζουν το ωοθηκικό πλέγμα από το οποίο αθροίζονται αντίστοιχα οι έσω ωοθηκικές φλέβες, οι οποίες εξέρχονται της πύλης και μαζί με τις αρτηρίες πορεύονται στον κρεμαστήρα σύνδεσμο και καταλήγουν στην κάτω κοίλη φλέβα δεξιά, και αριστερά στη νεφρική φλέβα. Τα λεμφαγγεία πορεύονται προς τους πλάγιους αορτικούς και παραορτικούς λεμφαδένες. Τα νεύρα προέρχονται από το ωοθηκικό πλέγμα που σχηματίζεται από το αορτικό και το συμπαθητικό πλέγμα και από ίνες από το 3^ο και 4^ο ιερό νεύρο.

2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ως καρκίνο ωοθηκών ορίζουμε την κακοήθη εξαλλαγή και καρκινική ανάπτυξη που προέρχεται από τα διαφορετικά τμήματα της ωοθήκης. Οι περισσότερες από αυτές τις μορφές καρκίνου προέρχονται από το επιθήλιο της ωοθήκης, την επιφάνεια, και αποτελούν τον επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών που αφορά πάνω από το 90% του συνόλου του καρκίνου ωοθηκών (6). Άλλες μορφές καρκίνου ωοθηκών προέρχονται είτε από βλαστικά κύτταρα είτε από γοναδοστροφματικά κύτταρα. Ωστόσο, σήμερα πιστεύεται πως και οι σάλπιγγες μπορούν επίσης να αποτελέσουν την πηγή καρκίνων ωοθηκών (7). Μια και οι ωοθήκες με τις σάλπιγγες σχετίζονται τόσο στενά ιστολογικά και ανατομικά μεταξύ τους, θεωρείται πως αυτά τα κύτταρα μπορούν να μιμηθούν καρκίνο ωοθηκών.

Ο καρκίνος ωοθηκών είναι η πέμπτη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες ενώ αποτελεί τον πλέον θανατηφόρο γυναικολογικό καρκίνο (8). Ο πιθανός κίνδυνος εμφάνισης της νόσου κατά την διάρκεια ζωής μιας γυναίκας, με μη επιβαρυνμένο οικογενειακό ιστορικό, υπολογίζεται στο 1.6%. Σε περιπτώσεις οικογενειακού ιστορικού καρκίνου ωοθηκών ο πιθανός κίνδυνος εμφάνισης ανέρχεται στο 5% και 7%, εάν ένα ή δύο αντιστοίχως μέλη αμέσου συγγένειας έχουν εμφανίσει την νόσο. Οι γυναίκες με κάποια μετάλλαξη στα γονίδια BRCA-1 ή BRCA-2 φέρουν έναν κίνδυνο από 25% έως και 60% ανάλογα με την μετάλλαξη (9). Η δεκαετής επιβίωση κυμαίνεται από 84.1% στο στάδιο IA έως 10.4% στο στάδιο IIIc (10).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αιτία του καρκίνου ωοθηκών παραμένει άγνωστη. Η ηλικία και το κληρονομικό ιστορικό αποτελούν επιβαρυντικούς παράγοντες κινδύνου. Οι μορφές καρκίνου με κληρονομική προδιάθεση μπορεί να σχετίζονται με μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια. Συνήθως παρατηρούνται στα γονίδια BRCA-1 και BRCA-2 αλλά σε γονίδια που σχετίζονται με τον μη πολυποειδή οικογενή καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι γυναίκες που αντιμετωπίζουν προβλήματα γονιμότητας, εκείνες που πάσχουν από ενδομητρίωση, οι άτοκες και εκείνες που έχουν κάνει μετεμμηνοπαυσιακή θεραπεία οιστρογονικής αποκατάστασης βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο. Αντιθέτως η χρήση των αντισυλληπτικών δισκίων ως μέθοδο

αντισύλληψης καθώς και η εγκυμοσύνη αποτελούν προστατευτικούς παράγοντες. Ο κίνδυνος είναι επίσης μικρότερος στις γυναίκες που υποστεί χειρουργική απολίνωση σαλπίγγων.

Ο καρκίνος ωοθηκών συνήθως δεν προκαλεί συμπτώματα στα αρχικά στάδια και όταν αυτά εμφανιστούν είναι συνήθως μη ειδικά (11). Η πρόωρη διάγνωση μπορεί να οδηγήσει σε ευνοϊκότερη επιβίωση, σύμφωνα με την υπόθεση ότι τα στάδια I και II εξελίσσονται σε III και IV αλλά κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχτεί. Οι περισσότερες γυναίκες με καρκίνο ωοθηκών αναφέρουν ένα ή περισσότερα συμπτώματα όπως κοιλιακός πόνος ή δυσχέρεια, μια κοιλιακή μάζα, μετεωρισμό, πόνο στην οσφύ, έπληξη προς ούρηση, δυσκοιλιότητα, κόπωση και αρκετά ακόμη μη ειδικά συμπτώματα. Επίσης ο καρκίνος ωοθηκών προκαλεί και αρκετά ειδικά συμπτώματα όπως πυελικό πόνο, μηνορραγία και απώλεια βάρους (12). Συχνά επίσης συνυπάρχει ασκτική συλλογή στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

Η διάγνωση του καρκίνου ωοθηκών περιλαμβάνει την κλινική εξέταση, πυελική εξέταση, εξέταση αίματος (ανίχνευση CA-125 και άλλους παράγοντες) και διακολπικό υπέρηχο. Η διάγνωση πρέπει να επιβεβαιωθεί με χειρουργική επέμβαση για να ελεγχτεί η περιτοναϊκή κοιλότητα, και να παρθούν δείγματα ασκτικού υγρού και βιοψίες για παθολογοανατομική ανάλυση. Η θεραπεία εκτός από την χειρουργική επέμβαση συχνά περιλαμβάνει χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (13).

Ιστογενετική Ταξινόμηση

Ο καρκίνος ωοθηκών ταξινομείται σύμφωνα την ιστολογική προέλευση του όγκου που προκύπτει έπειτα από παθολογοανατομική εξέταση. Η ιστολογική σύνθεση του όγκου υπαγορεύει την μετ' έπειτα κλινική αντιμετώπιση και θεραπεία των ασθενών καθώς και την πρόγνωση της νόσου. Ο πιο συχνός τύπος καρκίνου ωοθηκών είναι ο επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών που περιλαμβάνει κυρίως ορώδη, ενδομητριοειδή και βλεννώδη καρκινώματα. Οι γοναδοστρωματικοί όγκοι που περιλαμβάνουν τους οιστρογονοπαραγωγούς κοκκιοκυτταρικούς όγκους, όγκους κυττάρων Sertoli-Leydig και το αρρενοβλάστωμα αποτελούν το 8% των καρκίνων των ωοθηκών. Οι όγκοι από βλαστικά κύτταρα αποτελούν περίπου το 30% των όγκων που προέρχονται από τις ωοθήκες αλλά μόνο το 5% των καρκίνων ωοθηκών

μα και στην πλειονότητα τους πρόκειται για τερατώματα που είναι καλοήγη. Τέτοιοι όγκοι συνήθως εμφανίζονται σε νέες γυναίκες και κορίτσια. Η πρόγνωση εξαρτάται από την ειδική ιστολογική σύνθεση του όγκου αλλά γενικά είναι ευνοϊκή. Οι μικτοί όγκοι περιλαμβάνουν ιστολογικά στοιχεία από περισσότερες από μια από τις παραπάνω κατηγορίες. Ο καρκίνος ωοθηκών μπορεί βεβαίως να αποτελεί και δευτεροπαθή εστία , αποτέλεσμα μετάστασης από πρωτοπαθή εστία σε διαφορετικό μέρος του σώματος. Αυτοί οι μεταστατικοί καρκίνοι στις ωοθήκες αποτελούν το 7% των καρκίνων ωοθηκών. Οι πιο συχνόι καρκίνοι που δίνουν μεταστάσεις στις ωοθήκες είναι ο καρκίνος του μαστού και του γαστρεντερικού. Ο καρκίνος του στομάχου που δίνει μεταστάσεις στις ωοθήκες είναι περιγράφεται ως καρκίνος Krukenberg. Επιθηλιακοί καρκίνοι ωοθηκών μπορεί να προέρχονται από το περιτόναιο και να αποτελούν αποτέλεσμα μετάστασης με πρωταρχική εστία το περιτόναιο αλλά η θεραπευτική αντιμετώπιση δεν διαφέρει από αυτήν ενός πρωταρχικού επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών που περιλαμβάνει και το περιτόναιο.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι ιστολογικοί τύποι του πρωταρχικού καρκίνου ωοθηκών και η επίπτωση τους σε γυναίκες άνω των 20 ετών σύμφωνα με το πρόγραμμα μελέτης επιδημιολογικής επιβίωσης του Εθνικού Ινστιτούτου για τον καρκίνο των ΗΠΑ (14).

Ποσοστό των καρκίνων ωοθηκών σε γυναίκες άνω των 20 ετών.(%)	Ιστολογία	Πενταετής επιβίωση(%)
89.7	Επιθηλιακοί καρκίνοι ωοθηκών (αδενοκαρκίνωματα)	54.4
26.4	Θηλώδες ορώδες αδενοκαρκίνωμα	21.0
15.9	Οριακής κακοήθειας (borderline) αδενοκαρκίνωμα	98.2
12.6	Αδενοκαρκίνωμα χωρίς ειδική διαφοροποίηση	18.3

	9.8	Ενδομητριοειδής όγκος	70.9
	5.8	Ορώδες κυσταδενοκαρκίνωμα	44.2
	5.5	Θηλώδες	21
	4.2	Βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα	77.7
	4.0	Διαυγοκυτταρικός όγκος	61.5
	3.4	Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα	49.1
	1.3	Κυσταδενοκαρκίνωμα	50.7
	5.5	Καρκινώματα	
	4.1	Καρκίνωμα χωρίς ειδική διαφοροποίηση	26.8
	1.1	Γοναδοστρωματικοί όγκοι	87.8
	0.3	Άλλα καρκινώματα, ειδικά	37.3
	1.7	Μυλλέριοι όγκοι	29.8
	1.5	Όγκοι από βλαστικά κύτταρα	91.0
	0.8	Τεράτωμα	89.1
	0.5	Δυσγερμίνωμα	96.8
	0.3	Άλλα, ειδικά	85.1
	0.6	Μη ειδικά	23.0
	0.5	Επιδερμοειδής(καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων)	51.3
	0.2	Όγκος Brenner	67.9
	0.2	Άλλα, ειδικά	71.9

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.

Παθογένεση

Από τα έως σήμερα επιδημιολογικά και πειραματικά στοιχεία η καρκινογένεση στον καρκίνο των ωοθηκών οφείλεται κυρίως σε παράγοντες σχετιζόμενους με την ωορρηξία και την αναπαραγωγή, ενώ η μοριακή της βάση παραμένει εν πολλοίς άγνωστη. Υπάρχουν δυο κυρίως υποθέσεις για την ανάπτυξη του επιθηλιακού καρκίνου της ωοθήκης. Η πρώτη αφορά την αδιάκοπη ωορρηξία που με τον επαναλαμβανόμενο τραυματισμό και αποκατάσταση του επιθηλίου ευνοεί τις γενετικές μεταλλάξεις και τη κυτταρική νεοπλασία (15, 16, 17). Υπέρ της θεωρίας αυτής είναι η μείωση της συχνότητας του καρκίνου ωοθηκών στις γυναίκες με περιοδική διακοπή της ωορρηξίας, είτε λόγω λήψης αντισυλληπτικών είτε λόγω κήσεων. Η δεύτερη υπόθεση αφορά την υπερέκκριση γοναδοτροπινών που με τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων που προκαλεί οδηγεί σε υπερπλασία του επιθηλίου και πιθανή κακοήθη εξαλλαγή (16).

Όσον αφορά τα γεγονότα σε μοριακό επίπεδο που ευθύνονται για την ανάπτυξη του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών λίγα είναι γνωστά και χρειάζονται επιπλέον μελέτες για πιο σαφή συμπεράσματα. Έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις στα ογκογονίδια HER-2/neu (ERBB2), c-myc, K-ras και Akt και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια p-53, p-73, PTEN και p16 (18, 19, 20, 21). Μάλιστα έχουν βρεθεί με μεγαλύτερη συχνότητα συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε κάθε ιστολογικό τύπο επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών οι οποίες σχετίζονται με τον βαθμό διαφοροποίησης και την επιθετικότητα του κάθε ιστολογικού τύπου (22). Ειδικότερα οι μεταλλάξεις KRAS, BRAF, ERBB2 ανευρίσκονται στα δύο τρίτα των υψηλής διαφοροποίησης ορώδων επιθηλιακών καρκίνων ωοθήκης. Στους υψηλής διαφοροποίησης ενδομητριοειδείς ωοθηκικούς καρκίνους είναι συχνή η PTEN μετάλλαξη, στους μισούς βλεννώδεις καρκίνους διαπιστώνεται KRAS μετάλλαξη και στους διαυγοκυτταρικούς καρκίνους εμφανίζεται χαρακτηριστικά η PIK3CA μετάλλαξη. Οι άνω όγκοι (υψηλής διαφοροποίησης ορώδεις, υψηλής διαφοροποίησης ενδομητριοειδείς, διαυγοκυτταρικοί, βλεννώδεις και Brenner) εξελίσσονται βραδέως και διαγιγνώσκονται σε πρωιμότερο στάδιο. Για τους άνω λόγους έχει προταθεί να κατηγοριοποιούνται ως **τύπου I** (23). Στον αντίποδα βρίσκονται οι **τύπου II** ωοθηκικοί καρκίνοι. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι χαμηλής διαφοροποίησης ορώδεις, οι χαμηλής διαφοροποίησης ενδομητριοειδείς, οι κακοήθεις

μικτοί μεσοδερματικοί και οι αδιαφοροποίητοι. Οι τύπου II καρκίνοι χαρακτηρίζονται από τη συχνή παρουσία p53 μεταλλάξεων και σπανίως παρουσιάζουν μεταλλάξεις που εμφανίζουν οι τύπου I καρκίνοι. Επιπλέον, αντίθετα με τους τύπους I, οι τύπου II είναι επιθετικοί όγκοι που διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο, όταν η νόσος έχει επεκταθεί εκτός της ωοθήκης. Επίσης μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA-1, MSH-2, MLH-1, PMS 1 και 2, τα οποία συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA, συμβάλλουν στη δημιουργία κληρονομικών συνδρόμων με συμμετοχή επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών. Επιπλέον, οι ωοθηκικοί καρκίνοι παρουσιάζουν ευαισθησία σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες, όπως EGF, TGF, IL-6, ενώ πολύ μεγάλο είναι και το ενδιαφέρον για το ρόλο των μεταλλοπρωτεϊνών (21).

Μια ελκυστική υπόθεση που συνδυάζει τη θεωρία της σάλπιγγας, τη θεωρία της διάσπασης του επιθηλίου της ωοθήκης κατά την ωορρηξία και τη θεωρία καθοριστικών για την κακοήγη εξέλιξη μεταλλάξεων προτείνει τον εξής παθογενετικό μηχανισμό (24) : κατά τη στιγμή της ωορρηξίας, όταν η συνέχεια του επιθηλίου της ωοθήκης διασπάται, φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα από τους κροσσούς της σάλπιγγας εμφυτεύονται στην ωοθήκη και σχηματίζουν μια εγκυστωμένη κύστη. Αναλόγως με τις μεταλλάξεις που ακολουθούν η κύστη εξελίσσεται σε διαφορετικής κακοήθειας ορώδη επιθηλιακό καρκίνο. Αν πρόκειται για KRAS ή BRAF μετάλλαξη η κύστη εξελίσσεται σε όγκο οριακής κακοήθειας ο οποίος κατόπιν μπορεί να δώσει γένεση σε έναν υψηλής διαφοροποίησης ορώδη καρκίνο. Αν πρόκειται για p-53 μετάλλαξη, η αρχική κύστη εξελίσσεται σε STIC καρκίνο από την οποία μπορεί να προκύψει ένας χαμηλής διαφοροποίησης ορώδης καρκίνος. Εναλλακτικά προτείνεται ότι κατά τη στιγμή της ωορρηξίας εμφυτεύονται στην ωοθήκη κακοήγη κύτταρα που αποπίπτουν από ένα STIC καρκίνο που έχει ήδη αναπτυχθεί στους κροσσούς της σάλπιγγας. Όσον αφορά τους διαυγοκυτταρικούς και τους ενδομητριοειδείς όγκους, αυτοί αναπτύσσονται από κύτταρα ενδομητρίου που φθάνουν στην ωοθήκη από παλινδρόμηση μέσω των σαλπίγγων κατά την εμμηνορροσία και εμφυτεύονται σχηματίζοντας μία ενδομητριοειδή κύστη η εξέλιξη της οποίας θα εξαρτηθεί από τις μεταλλάξεις που θα λάβουν χώρα. Υπέρ της υπόθεσης αυτή υπάρχουν επιδημιολογικά στοιχεία ότι η απολίνωση σαλπίγγων προστατεύει έναντι των διαυγοκυτταρικών και ενδομητριοειδών καρκίνων.

Συμπερασματικά, οι επιθηλιακοί καρκίνοι των ωοθηκών στην πλειοψηφία τους μπορεί να μην προέρχονται από την ωοθήκη, αλλά είτε από τη σάλπιγγα, είτε

από το ενδομήτριο που παλινδρομεί μέσω της σάλπιγγας. Εάν η θεωρία της σάλπιγγας-ενδομητρίου αποδειχθεί αληθής και δεδομένης της απουσίας πρακτικά ενός αποτελεσματικού screening για τον καρκίνο των ωοθηκών, η θεραπευτική συνέπεια θα ήταν τεράστια για τις ασθενείς καθώς μόνη της η σαλπινγεκτομή με διατήρηση των ωοθηκών πιθανόν θα αρκούσε ως προφυλακτικό μέτρο ιδίως για τις γυναίκες υψηλού κινδύνου. Είναι βέβαια εξαιρετικά δύσκολο να διεξαχθούν τέτοιες συγκριτικές μελέτες.

Επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι μορφές καρκίνου που προέρχονται από την επιφάνεια, επιθήλιο της ωοθήκης, αποτελούν τον επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών που αφορά πάνω από το 90% του συνόλου του καρκίνου των ωοθηκών. Στις ΗΠΑ ο καρκίνος των ωοθηκών επιφέρει περισσότερους θανάτους απ' όσους επιφέρουν όλες οι άλλες γυναικολογικές κακοήθειες μαζί. Παγκοσμίως, κάθε χρόνο σε 204.000 γυναίκες διαγιγνώσκεται καρκίνος ωοθηκών και 125.000 πεθαίνουν από την νόσο (25). Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί την συντριπτική πλειονότητα αυτών των περιπτώσεων. Μέχρι και σήμερα δεν υπάρχει μια αποτελεσματική μέθοδος ανίχνευσης της νόσου ενώ προκαλεί ελάχιστα πρώιμα συμπτώματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στα τρία τέταρτα των ασθενών η νόσος να διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Η χειρουργική ριζική εκρίζωση του όγκου, ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία η οποία βασίζεται στην πλατίνη συνήθως επιφέρει κλινική ύφεση. Ωστόσο μέχρι και το 80% των ασθενών θα υποτροπιάσουν με τελικό αποτέλεσμα την πρόοδο της νόσου και θάνατο.

Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου

Μια στις 78 Αμερικανίδες (1.3%) θα αναπτύξει καρκίνο ωοθηκών κατά την διάρκεια της ζωής της. Παγκοσμίως το ποσοστό αυτό υπολογίζεται στο 1.6%. Επειδή η επίπτωση της νόσου εμφανίζει μικρή σταδιακή μείωση από τις αρχές της δεκαετίας του 90, ο καρκίνος ωοθηκών έχει πέσει στην όγδοη αιτία καρκίνου στις γυναίκες. Ωστόσο, σε ελάχιστες ασθενείς διαγιγνώσκεται πρώιμα και θεραπεύονται. Για αυτό το λόγο ο καρκίνος ωοθηκών παραμένει η πέμπτη αιτία θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο και πρώτος ανάμεσα στις γυναικολογικές κακοήθειες (8). Συνολικά, η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι στο εξηκοστό έτος.

Πολυάριθμοι περιβαλλοντολογικοί, γενετικοί και αναπαραγωγικοί παράγοντες σχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί (ΠΙΝΑΚΑΣ 2). Ο πιο σημαντικός είναι το οικογενειακό ιστορικό

καρκίνου ωοθηκών ή μαστού και περίπου το 5 έως 10% των ασθενών φέρουν κάποια γεννητική μετάλλαξη. Στο υπόλοιπο 90 με 95% των ασθενών που δεν εντοπίζεται κάποια γεννητική μετάλλαξη που να σχετίζεται με τον καρκίνο ωοθηκών, οι περισσότεροι παράγοντες κινδύνου σχετίζονται μ' ένα πρότυπο αδιάλειπτων γεννητικών κύκλων ωοθυλακιορρηξίας κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής. Η επαναλαμβανόμενη διέγερση του επιφανειακού επιθηλίου της ωοθήκης θεωρείται πως μπορεί να οδηγήσει σε κακοήγη εξαλλαγή.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΩΟΘΗΚΩΝ
Ατοκία
Πρόωρη εμμηναρχή
Αργοπορημένη εμμηνόπαυση
Λευκή φυλή
Ηλικία
Κάτοικοι Βορείου Ευρώπης και Βορείου Αμερικής
Οικογενειακό ιστορικό

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.

Η ατοκία σχετίζεται με μεγάλες περιόδους επαναλαμβανόμενων γεννητικών κύκλων ωοθυλακιορρηξίας και οι γυναίκες που δεν έχουν κάνει παιδιά έχουν διπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο ωοθηκών (17). Εκείνες με ιστορικό στειρότητας αντιμετωπίζουν ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο. Αν και οι λόγοι που συμβαίνει αυτό δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί, σήμερα πιστεύεται ότι είναι πιο πιθανόν να σχετίζεται με κάποια μετάλλαξη παρά να πρόκειται για ένα ιατρογενές

λάθος από την χρήση φαρμάκων που επάγουν την ωοθυλακιορρηξία, όπως πιστευόταν παλαιότερα. Για παράδειγμα, οι γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας που έλαβαν φαρμακευτική θεραπεία και κατάφεραν να επιτύχουν μια γέννηση ενός φυσιολογικού τέκνου δεν έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο ωοθηκών (26). Γενικά ο κίνδυνος μειώνεται με κάθε φυσιολογική γέννα, καταλήγοντας σ' ένα πλατό στις γυναίκες που έχουν κάνει πέντε παιδιά (27). Μια ενδιαφέρουσα θεωρία για να εξηγήσει την προστατευτική δράση που ασκεί η εγκυμοσύνη είναι ίσως ότι εκτός της αναστολής της ωοθυλακιορρηξίας αυξάνει την απόπτωση των προκαρκινικών κυττάρων της ωοθήκης (28).

Η πρόωρη εμμηναρχή και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση επίσης, συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο ωοθηκών. Αντιθέτως ο μητρικός θηλασμός φαίνεται πως ασκεί προστατευτική δράση πιθανώς παρατείνοντας την αμηνόρροια (29). Η μακρόχρονη χρήση αντισυλληπτικών δισκίων από του στόματος με την πρόληψη της ωοθυλακιορρηξίας μειώνει επίσης τον κίνδυνο για καρκίνο ωοθηκών κατά 50%. Η διάρκεια μάλιστα της προστασίας φθάνει τα 25 έτη από την τελευταία χρήση (30). Αντιθέτως, η χρήση οιστρογονικής θεραπείας αποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο (31).

Ανάμεσα στα διαφορετικές εθνικές και φυλετικές ομάδες οι λευκές γυναίκες εμφανίζουν την μεγαλύτερη επίπτωση του καρκίνου ωοθηκών (6). Σε σύγκριση με τις έγχρωμες γυναίκες και τις γυναίκες από την Λατινική Αμερική, ο κίνδυνος είναι αυξημένος κατά 30% και 40% αντίστοιχα (32). Παρόλο που ο ακριβής λόγος που συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστός, οι φυλετικές διακρίσεις και οι διαφοροποιήσεις στην χειρουργική αντιμετώπιση παγκοσμίως ίσως επηρεάζουν κάπως αυτές τις διαφορές.

Η απολίνωση των σαλπίγγων και η υστερεκτομή μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ωοθηκών στις γυναίκες που υφίστανται αυτές τις επεμβάσεις (33). Θεωρείται πως κάθε γυναικολογική επέμβαση που αποκλείει τις ωοθήκες από διέγερση που προέρχεται από το κατώτερο γεννητικό σύστημα μπορεί να έχει παρόμοια προστατευτική επίδραση. Για παράδειγμα, οι γυναίκες που χρησιμοποιούν πούδρα στην περιοχή του περινέου αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο (34).

Η επίπτωση του καρκίνου ωοθηκών αυξάνεται καθώς αυξάνει και η ηλικία των γυναικών μέχρι την μέση περίπου της έβδομης δεκαετίας τους και στην συνέχεια εμφανίζει μια ελάχιστη σταδιακή μείωση μετά τα ογδόντα χρόνια ζωής (32). Γενικά, θεωρείται πως η ηλικία παρέχει ένα εκτεταμένο χρονικό διάστημα για να αθροιστούν τυχαίες γεννητικές μεταλλάξεις στο επιθήλιο της επιφάνειας της ωοθήκης.

Οι γυναίκες που διαμένουν στη Βόρεια Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική καθώς και σε κάθε αναπτυγμένη δυτική χώρα όπως για παράδειγμα το Ισραήλ έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Παγκοσμίως η επίπτωση ποικίλει πολύ, αλλά οι αναπτυσσόμενες χώρες και η Ιαπωνία εμφανίζουν τα χαμηλότερα ποσοστά. Τοπικές διαιτητικές συνήθειες ίσως να ευθύνονται μερικώς (35). Για παράδειγμα, η κατανάλωση τροφών χαμηλών σε λιπαρά αλλά υψηλών σε ινική, καροτίνη και βιταμίνες έχουν προστατευτική επίδραση (36).

Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου ωοθηκών σε πρώτου βαθμού συγγενή, είτε πρόκειται για αδερφή, μάνα ή κόρη τριπλασιάζει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου κατά την διάρκεια ζωής της γυναίκας. Ο κίνδυνος αυξάνει ακόμη περαιτέρω όταν κάποια έχει δύο ή περισσότερες συγγενείς πρώτου βαθμού που έχουν προσβληθεί. Η ταυτοποίηση των γυναικών υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου που έχουν συγγενείς με καρκίνο ωοθηκών, μαστού και παχέος εντέρου αποτελεί σήμερα την καλύτερη στρατηγική πρόληψης. (37). Εάν το οικογενειακό ιστορικό αποτελείται κυρίως από καρκίνο του παχέος εντέρου, οι κλινικοί γιατροί πρέπει να λάβουν υπόψη τους την πιθανότητα του μη πολυποειδή οικογενή καρκίνου του παχέος εντέρου. (HNPCC) που είναι επίσης γνωστός ως σύνδρομο Lynch. Οι ασθενείς με αυτό το σύνδρομο εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου (80%) καθώς και καρκίνου των ωοθηκών (10%-12%) κατά την διάρκεια της ζωής τους.

Ιδιαίτερης αναφοράς χρήζει η συσχέτιση των γονιδίων BRCA-1 και BRCA-2 με τον καρκίνο μαστού και ωοθηκών. Πρόκειται για δύο ογκοκατασταλτικά γονίδια των οποίων οι πρωτεΐνες που παράγουν αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του DNA με τελικό σκοπό να διατηρούν την δομή των χρωμοσωμάτων ανέπαφη. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, όπως είναι φυσικό, αυξάνουν την γεννητική αστάθεια και την πιθανότητα τα κύτταρα που τις υφίστανται να υποστούν κακοήγη εξαλλαγή (38, 39). Το γονίδιο BRCA-1 βρίσκεται στο

χρωμόσωμα 17q21 . Οι ασθενείς με κάποια γονιδιακή μετάλλαξη στο BRCA-1, εμφανίζουν δραματικά αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν και καρκίνο μαστού (45%-85%) και καρκίνο ωοθηκών (20%-45%). Το BRCA-2, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q12 και γενικά αυξάνει λιγότερο τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου μαστού (30%-50%) και ωοθηκών (10%-20%) (40, 41). Και τα δύο αυτά γονίδια, κληρονομούνται μ' ένα αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο, μεταβλητής εκφραστικότητας. Οπότε, ένας φορέας έχει 50% πιθανότητα να περάσει το μεταλλαγμένο γονίδιο στο γιο ή την κόρη του αλλά είναι αβέβαιο εάν ο αυτή που θα φέρει την γονιδιακή μετάλλαξη θα αναπτύξει την καρκίνο μαστού ή ωοθηκών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι εκδηλώσεις των μεταλλάξεων των γονιδίων BRCA-1 και BRCA-2 να μην εμφανίζονται σε κάθε γενιά αλλά να παραλείπουν γενιές. Ο δραματικός τρόπος που επηρεάζουν οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά τον κίνδυνο μιας γυναίκας να αναπτύξει καρκίνο μαστού και ωοθηκών καθιστά εξαιρετικά σημαντική την γεννητική δοκιμασία για να αναγνωριστούν οι γυναίκες με γονιδιακές μεταλλάξεις και να προβούν σε προφυλακτική χειρουργική επέμβαση και να αποτρέψουν την ανάπτυξη καρκίνου.

Ιστολογία

Τα επιθηλιακά νεοπλάσματα προέρχονται από μεσοθηλιακά κύτταρα της επιφάνειας της ωοθήκης και ταξινομούνται ιστολογικά όπως παρουσιάστηκε και προηγουμένως σε διάφορες κατηγορίες (Πίνακας 1).

Επισημαίνουμε πως οι όγκοι από επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών αποτελούν πάνω από το 60% των όγκων της ωοθήκης και πάνω από το 90% των κακοήθων όγκων της ωοθήκης.

Το ορώδες κυσταδενοκαρκίνωμα είναι ο πιο συχνός κακοήθης όγκος της ωοθήκης, αποτελώντας περίπου το 75%-80% όλων των επιθηλιακών καρκίνων. Αυτά τα νεοπλάσματα τις περισσότερες φορές είναι αμφοτερόπλευρα και στο 85% των περιπτώσεων έχουν εξαπλωθεί πέραν της ωοθήκης την στιγμή της διάγνωσης. Περισσότεροι από το 50% των όγκων εκτείνονται πάνω από 15 εκατοστά σε διάμετρο

και οι παθολογοανατομικές τομές αποκαλύπτουν περιοχές συμπαγείς, αιμορραγικές, νεκρωτικές, κυστικές καθώς και προσκολλήσεις σε παρακείμενους ιστούς (42, 43). Οι μονόχωρες ή πολύχωρες κύστει συχνά περιέχουν θηλώδες επιθήλιο που προβάλλει στον αυλό της κύστης. Ιστολογικά, τα ορώδη καρκινώματα της ωοθήκης ομοιάζουν με την ενδοσάλπιγγα και παρουσιάζουν ήπια ως μετρίου βαθμού κυτταρική ατυπία και κάποιες φορές μιτωτικές δομές από στρώματα πλακωδών κυττάρων δίκην θυσσάνου. Ασβεστοποιήσεις και αποτιτανώσεις σπάνια ανευρίσκονται στα ορώδη καρκινώματα. Ο βαθμός διαφοροποίησης βασίζεται στον βαθμό διατήρησης του θηλώδους επιθηλίου. Τα περισσότερα ορώδη νεοπλάσματα εμφανίζουν φτωχή διαφοροποίηση. Τα ορώδη νεοπλάσματα της ωοθήκης χαμηλής κακοήθειας εμφανίζουν ιστολογικά στοιχεία υποδηλωτικά τόσο κακοήθειας όσο και καλοήθειας. Ενώ παρουσιάζουν κυτταρική ατυπία και μιτωτική δραστηριότητα δεν διηθούν το στρώμα. Αποτιτανομένα στοιχεία σ' αυτά συχνά εμφανίζονται. Αυτοί οι όγκοι σπάνια δίνουν μεταστάσεις, αναπτύσσονται κυρίως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σχετίζονται με καλή πρόγνωση.

Τα βλεννώδη νεοπλάσματα της ωοθήκης αποτελούν το 10% των όγκων της ωοθήκης. Σε αντίθεση με τα ορώδη νεοπλάσματα, τα βλεννώδη είναι αμφοτερόπλευρα σε λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων. Τα βλεννώδη νεοπλάσματα μπορούν να αποκτήσουν μεγάλο μέγεθος. Έχουν αναφερθεί νεοπλάσματα που ζυγίζουν πάνω από 65 kg. Ωστόσο, το μέσο μέγεθος αυτών των κακοηθειών είναι 18-20 εκατοστά (44). Οι παθολογοανατομικές τομές αυτών των κακοηθειών συνήθως αποκαλύπτουν πολύχωρες κύστει που περιέχουν υδαρή βλέννη. Το περίβλημα του όγκου αποτελείται από κύτταρα με υψηλού βαθμού ατυπία και μεγάλη μιτωτική δραστηριότητα. Ιστολογικά, τα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα των ωοθηκών ομοιάζουν με το επιθήλιο του ενδοτραχήλου. Τα κύτταρα έχουν έναν μεγάλο υπερχρωματικό πυρήνα και έναν εμφανή πυρηνίσκο. Τα καρκινώματα αυτά παρουσιάζουν μεγάλη ιστολογική ποικιλομορφία στα διαφορετικά τμήματα του όγκου και για αυτό είναι απαραίτητο να διενεργείται εκτεταμένη δειγματοληψία. Συνίσταται να εξετάζεται τουλάχιστον μια τομή ανά εκατοστό του όγκου ώστε να εντοπιστεί η εστία με το μεγαλύτερο βαθμό κακοήθειας. Η διαφοροποίηση του βλεννώδους κυσταδενοκαρκινώματος σχετίζεται με την διατήρηση της αδενώδους αρχιτεκτονικής του όγκου. Αυτοί οι όγκοι θα πρέπει να διακριθούν από μεταστατικούς βλεννώδεις όγκους που προέρχονται από το κόλον, το ορθό ,τη

σκωληκοειδή απόφυση, τον ενδοτραχήλο και το πάγκρεας που έχουν παρόμοια αρχιτεκτονική δομή. Τα βλεννώδη νεοπλάσματα περιλαμβάνουν τόσο επιθετικά καρκινώματα όσο και όγκους χαμηλής κακοήθειας. Τα βλεννώδη καρκινώματα χαμηλής κακοήθειας χαρακτηρίζονται ιστολογικά από αρκετούς κυτταρικούς τύπους που περιλαμβάνουν κυλινδρικά κύτταρα παρόμοιας ιστολογικής δομής με του ενδοτραχήλου, κυλινδρικά κύτταρα με ηωσινοφιλο κυτταρόπλασμα παρόμοιας ιστολογικής δομής με του γαστρεντερικού, κυπελλοειδή κύτταρα και βασικά ενδοκρινή κύτταρα. Αν και υπάρχει κυτταρική ατυπία και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα η κυτταρική διαστρωμάτωση δεν ξεπερνά τις 2-3 στοιβάδες και δεν συνυπάρχει διήθηση του στρώματος.

Το ψευδομύζωμα του περιτοναίου είναι μια σπάνια κατάσταση η οποία προκαλείται σε συνδυασμό με βλεννώδη νεοπλάσματα της ωοθήκης και προκαλεί την προοδευτική συσσώρευση βλέννας στην περιτοναϊκή κοιλότητα η οποία προέρχεται από σταδιακή διαρροή ενός νεοπλάσματος. Τις περισσότερες φορές σχετίζεται με νεοπλάσματα χαμηλής κακοήθειας. Ωστόσο μπορεί να σχετίζεται με κυσταδενοκαρκινώματα της ωοθήκης και της σκωληκοειδούς απόφυσης. Αν και είναι σπάνια και εμφανισιακά καλοήγη το ψευδομύζωμα του περιτοναίου έχει μια πορεία εκτεταμένη και δυνητικά νοσηρή που καταλήγει στην απόφραξη του εντέρου με θνησιμότητα που αγγίζει το 50%.

Τα ενδομητριοειδή νεοπλάσματα της ωοθήκης, αποτελούν το 10% των επιθηλιακών όγκων και επιδεικνύουν ένα αδеноματώδη πρότυπο που ομοιάζει με το αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου (45). Είναι αμφοτερόπλευρα στο 30%-50% των περιπτώσεων. Σπάνια ,σε λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων, αυτοί οι όγκοι αναπτύσσονται σε εστίες ενδομητρίωσης. Ο βαθμός διαφοροποίησης βασίζεται στον βαθμό που διατηρείται το αδενικό επιθήλιο. Το 30% των ασθενών με ενδομητριοειδή καρκίνο ωοθήκης εμφανίζουν συγχρόνως και ενδομητριοειδή καρκίνο της μήτρας που αποτελεί συνήθως δεύτερη πρωτοπαθή εστία και πολύ σπάνια προϊόν μετάστασης. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι στο 25% των γυναικών έως 45 ετών στις οποίες εντοπίστηκε τύπου I ενδομητριοειδής καρκίνος της μήτρας συνυπήρχαν και κακοήθειες στις ωοθήκες. Από αυτούς όγκους, το 88% ήταν σύγχρονοι πρωτοπαθείς και το 92% ήταν ενδομητριοειδή καρκίνοι.

Το διαυγοκυτταρικά νεοπλάσματα της ωοθήκης επίσης αναφέρονται ως μεσονεφρικά νεοπλάσματα της ωοθήκης επειδή περιλαμβάνουν διαυγή κύτταρα που μοιάζουν με αυτά του καρκίνου νεφρού (46). Αποτελούν λιγότερο από το 1% των επιθηλιακών καρκίνων ωοθηκών. Αυτοί οι όγκοι σπάνια αποκτούν το μέγεθος των ορώδων και βλεννώδων νεοπλασμάτων. Οι διαυγοκυτταρικοί καρκίνοι είναι επιθετικοί και σχετίζονται με υπερασβιασταιμία και υπερπυρεξία. Στις παθολογοανατομικές τομές, παρατηρούνται τόσο κυστικές όσο και συμπαγείς περιοχές. Η εξωτερική επιφάνεια είναι λεία αλλά έχει ένα τραχύ περίγραμμα. Ιστολογικά, δύο τύποι κυττάρων είναι παρόντες, τα διαυγοκυτταρικά και τα κύτταρα δίκην πρόκας. Μερικές φορές είναι δύσκολη η διάκριση των διαυγοκυτταρικών καρκίνων από τα βλεννώδη καρκινώματα. Η αντίδραση στην επίδραση οξέως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να τα διαχωρίσει καθώς είναι έντονα θετική στα βλεννώδη νεοπλάσματα και αδύναμη στα διαυγοκυτταρικά.

Τα μεταβατικού τύπου νεοπλάσματα (όγκοι Brenner) της ωοθήκης αποτελούν λιγότερο από το 1% των επιθηλιακών καρκίνων. Τα κύτταρα που τα συνθέτουν, ομοιάζουν με τα αυτά του χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης μεταβατικού τύπου καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Θεωρείται πως οι όγκοι Brenner όπως και οι βλεννώδεις όγκοι προέρχονται με μεταπλασία από το μεταβατικού τύπου επιθήλιο που εντοπίζεται στην σαλπινγο-μεσοθηλιακή συμβολή (24). Οι ασθενείς συνήθως διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο και εμφανίζουν χειρότερη πρόγνωση από τα υπόλοιπα επιθηλιακά νεοπλάσματα.

Τα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα της ωοθήκης αποτελούν λιγότερο από το 10% των επιθηλιακών καρκίνων. Χαρακτηρίζονται από την απουσία διακριτών ιστολογικών στοιχείων που να μας επιτρέπει να τα τοποθετήσουμε σε μια από τις υπόλοιπες ιστολογικές κατηγορίες. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη βοηθά στην διαφοροποίηση τους από το λέμφωμα, τη λευχαιμία ή το σάρκωμα. Το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα αναπτύσσεται ταχέως, διασπείρεται εκτός ωοθήκης και έχει την πτωχότερη πρόγνωση απ' όλους τους επιθηλιακούς καρκίνους της ωοθήκης.

Συμπτώματα

Ο καρκίνος ωοθηκών συνήθως αναπτύσσεται ως μια «ύπουλη» νόσος καθώς τα σημεία και συμπτώματα του τις περισσότερες φορές απουσιάζουν κι όταν αυτά εμφανίζονται συνήθως είναι μη ειδικά. Οι περισσότεροι καρκίνοι ωοθηκών προκαλούν ελάχιστα συμπτώματα μέχρι η νόσος να εξαπλωθεί ευρύτατα στην περιτοναϊκή κοιλότητα (11). Το 2007, το ίδρυμα για τον γυναικολογικό καρκίνο (47), η εταιρεία γυναικολόγων ογκολόγων και η αντικαρκινική Εταιρεία της Αμερικής κοινοποίησε την ακόλουθη δήλωση συναίνεσης σχετικά με τα συμπτώματα του καρκίνου των ωοθηκών:

« Ο καρκίνος της ωοθήκης χαρακτηρίζεται ως "σιωπηλός δολοφόνος", διότι τα συμπτώματα δεν αναπτύσσονται μέχρις ότου η νόσος έχει προχωρήσει και η πιθανότητα ίασης ή ύφεσης γίνει φτωχή ».

Ωστόσο, τα ακόλουθα συμπτώματα είναι πολύ πιο πιθανό να συμβούν σε γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών από τις γυναίκες του γενικού πληθυσμού. Αυτά τα συμπτώματα περιλαμβάνουν:

- Φούσκωμα
- Πυελικό ή κοιλιακό άλγος
- Πόνος στην πλάτη ή τα πόδια
- Διάρροια, αέρια, ναυτία, δυσκοιλιότητα, δυσπεψία
- Δυσκολία στο φαγητό ή αίσθημα πληρότητας γρήγορα
- Ούρηση (έπληξη ή διαταραχές στην συχνότητα)
- Πόνος κατά τη σεξουαλική επαφή
- Ανώμαλη κολπική αιμορραγία
- Αναπνευστικό πρόβλημα

Ένα ιστορικό από μη ειδικά γαστρεντερικά ενοχλήματα , που περιλαμβάνουν ναυτία , δυσπεψία και διαταραχές στις λειτουργικές συνήθειες του εντέρου είναι ιδιαίτερα συχνό. Αίσθημα πληρότητας και φουσκώματος ως αποτέλεσμα της ασκτικής συλλογής είναι γενικά σημεία προχωρημένης νόσου. Διαταραχές στις συνήθειες του εντέρου , όπως δυσκοιλιότητα και μείωση στο διαμέτρημα των κοπράνων συχνά παρατηρούνται. Ευμεγέθεις όγκοι μπορούν να

προκαλέσουν ένα αίσθημα πυελικού βάρους και πίεσης. Σπάνια οι όγκοι των ωοθηκών προκαλούν αποφρακτικά συμπτώματα και προξενούν σοβαρό πόνο, κατακράτηση ούρων και απόφραξη του εντέρου. Εκτός της κοιλιακής χώρας εντοπίσεις της νόσου αφορούν αρκετά συχνά πλευριτική συλλογή και λιγότερο συχνά προσβολή πνευμονικού παρεγχύματος, οπότε η ασθενής παραπονείται για δυσπνοια (48).

Διαταραχές της εμμήνου ρήσεως παρατηρούνται στο 15% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας που φέρουν μια νεοπλασία στις ωοθήκες. Ανώμαλη κολπική αιμορραγία μπορεί να συμβεί σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών όταν συνυπάρχει ένα σύγχρονο ενδομήτριο νεόπλασμα ή έχουν αναπτυχθεί μεταστάσεις χαμηλότερα στο γεννητικό σύστημα. Σπάνια, μια υπερβολική παραγωγή ανδρογόνων και οιστρογόνων παρατηρείται σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών πιθανώς λόγω της διέγερσης των κυττάρων της θήκης, κοκκιωδών κυττάρων που περιβάλλουν το νεόπλασμα. Η υπερπλασία του στρώματος και της θήκης της ωοθήκης επίσης σχετίζονται με την υπερπαραγωγή ανδρογόνων η οποία επηρεάζει τον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Οι όγκοι των κοκκιωδών κυττάρων της θήκης είναι οι τυπικά οιστρογονοπαραγωγικοί όγκοι οι οποίοι εμφανίζονται με ανώμαλη κολπική αιμορραγία.

Διάγνωση

Η πρόγνωση του καρκίνου ωοθηκών είναι πολύ καλύτερη όταν η νόσος διαγιγνώσκεται ενώ βρίσκεται ακόμη περιορισμένη στην ωοθήκη. Στις μέρες μας αν και έχουν αναπτυχθεί πολλές κλινικές δοκιμασίες για την ανίχνευση της νόσου, δεν υπάρχει ακόμη μια μέθοδος που να χρησιμοποιείται ως αποτελεσματική μέθοδος ανίχνευσης της νόσου στον γενικό πληθυσμό. Ο υπερηχογραφικός έλεγχος μπορεί να ανιχνεύσει την πλειοψηφία των καρκίνων ωοθηκών αλλά δεν έχει μεγάλη ειδικότητα. Ο πιο χαρακτηριστικός δείκτης του επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών είναι το καρκινικό αντιγόνο CA-125. Το CA-125 είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη, που τα επίπεδα της στον ορό ανιχνεύονται μέσω μιας ανοσολογικής ανάλυσης. Το ανώτατο αποδεκτό όριο της στον ορό που θεωρείται φυσιολογικό είναι τα 35 IU/ml αλλά αυτό αποτελεί περισσότερο μια αυθαίρετη παραδοχή. Η χρησιμοποίηση του CA-125 ως αποτελεσματικής μεθόδου ανίχνευσης των ασυμπτωματικών γυναικών

χαμηλού κινδύνου δεν συνίσταται. Ωστόσο, το CA-125 ίσως μπορεί να αποτελέσει τον ρόλο της γενικής μεθόδου ανίχνευσης της νόσου στις γυναίκες υψηλού κινδύνου που φέρουν κάποια γεννητική μετάλλαξη. Η εύρεση μιας μεθόδου ανίχνευσης του καρκίνου ωοθηκών σε αρχικό στάδιο στον γενικό πληθυσμό παραμένει ακόμη δύσκολο επίτευγμα έως ότου ανακαλυφτούν παράγοντες με μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα. Δυστυχώς η τακτική πυελική εξέταση είναι μια εμφανέστατα αδύναμη μέθοδος ανίχνευσης με εξαιρετικά χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Το 10% των όγκων μικρότερων από 10 εκατοστά σε μέγεθος διαφεύγουν της τακτικής φυσικής εξέτασης και το μέγεθος του όγκου προβλέπεται σωστά με απόκλιση 2 εκατοστών μόνο στο 68% των ασθενών. Οι σύγχρονες στρατηγικές ανίχνευσης εστιάζουν στην ανίχνευση των αντιγόνων που σχετίζονται με τον όγκο όπως το CA-125 και στον υπερηχογραφικό έλεγχο των αδένων. Ωστόσο η έλλειψη ειδικών συμπτωμάτων του καρκίνου ωοθηκών και η χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα των κλινικών δοκιμασιών που έχουμε στην διάθεση μας μέχρι και σήμερα απέτρεψαν την εφαρμογή μιας τακτικής μεθόδου ανίχνευσης του καρκίνου ωοθηκών στον γενικό πληθυσμό.

Μια ασθενής στην οποία παρατηρείται κατά την κλινική εξέταση η ύπαρξη μιας πυελικής μάζας πρέπει να αξιολογείται με ένα σύντομο και με μικρό κόστος τρόπο, που να οδηγεί άμεσα σε πιθανές διαγνώσεις. Η διαφορική διάγνωση μιας πυελικής μάζας επηρεάζεται από την ηλικία της ασθενούς, τα χαρακτηριστικά της μάζας κατά την πυελική εξέταση και την απεικονιστική εμφάνιση της μάζας. Γενικά, ένα κορίτσι πριν την εφηβεία και μια μετεμμηνοπαυσιακή γυναίκα διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου ωοθηκών. Ενώ μια γυναίκα που βρίσκεται σε αναπαραγωγική ηλικία έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξει μια λειτουργική κύστη στην ωοθήκη ή ενδομητρίωση.

Φυσική εξέταση

Αν και το επίκεντρο του ενδιαφέροντος της φυσικής εξέτασης σε μια ασθενή που υποψιαζόμαστε νεόπλασμα στα εξαρτήματα είναι η πύελος, είναι σημαντικό να διενεργείται μια πιο ενδελεχής εξέταση. Ιδιαίτερη προσοχή χρήζει η λεμφαδενική

εξέταση ειδικά στις υπερκλειδία και βουβωνική χώρα. Μεταστατική νόσος στο δέρμα σπάνια παρατηρείται στον καρκίνο ωοθηκών. Ως λεμφαδένας της αδερφής Mary Joseph αναφέρεται η μεταστατική εστία στον ομφαλό. Η εξέταση της κοιλίας συχνά παρέχει σημαντικές πληροφορίες. Η κοιλιακή διάταση είναι ένα από τα πιο συχνά ευρήματα. Η παρουσία βατραχοειδούς κοιλίας και μετακινούμενης αμβλύτητας κατά την επίκρουση της κοιλίας υποδηλώνει την παρουσία ασκίτη ή μιας μεγάλης πυελικής μάζας. Όταν μαζί με αυτά τα σημεία, παρατηρείται τυμπανικός ήχος κατά την επίκρουση του πλάγιου κοιλιακού τοιχώματος τότε είναι πιθανόν να υπάρχει μια μεγάλη κοιλιακή μάζα που μετατοπίζει το έντερο στην περιφέρεια. Αντιθέτως όταν παρατηρείται τυμπανικός ήχος κατά την επίκρουση του κυρίως επιγαστρίου, αυτό υποδηλώνει ασκίτικη συλλογή. Όταν η ενδοκοιλιακή πίεση από την παρουσία ασκίτικης συλλογής αυξηθεί αρκετά είναι δυνατόν να παρατηρήσουμε εκτός από κοιλιακή διάταση και αναστροφή του ομφαλού της ασθενούς. Μια προσεχτική και σχολαστική πυελική εξέταση παρέχει πολλά ενδιαφέροντα ευρήματα ως προς την διαφορική διάγνωση μιας πυελικής μάζας. Παρακάτω αναγράφονται τα χαρακτηριστικά μιας πυελικής μάζας τα οποία πρέπει να αναζητούνται κατά την πυελική εξέταση.

Χαρακτηριστικά πυελικής μάζας κατά την φυσική εξέταση

<u>Καλοήθεια</u>	<u>Κακοήθεια</u>
Κινητή	Σταθερή
Κυστική	Συμπαγής
Μονόπλευρη	Αμφοτερόπλευρη
Λεία	Οζώδης
Σαφή όρια	Χωρίς σαφή οριοθέτηση

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.

Μονόπλευρες κυστικές μάζες σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας είναι καλοήθειες σε περισσότερο από το 95% των περιπτώσεων. Αυτές οι μάζες, με μέγεθος μικρότερο από 6-8 εκατοστά όταν παρατηρούνται κατά την διάρκεια ενός γεννητικού κύκλου συνήθως πρόκειται για λειτουργικές κύστεις η οποίες υποχωρούν. Ωστόσο, μια μάζα που αυξάνει σε μέγεθος και σχετίζεται με αίσθημα άλγους χρήζει χειρουργικής αντιμετώπισης. Μια κυστική ακίνητη, προσκολλημένη μάζα ίσως είναι υδροσάλπιγγα ή σαλπιγγικό απόστημα. Ακίνητες μονόπλευρες συμπαγείς μάζες με παρουσία όζων υποδηλώνουν αλλά δεν είναι διαγνωστικές κακοήθειας των ωοθηκών. Ωστόσο κανένα από τα χαρακτηριστικά που διαπιστώνονται κατά την φυσική εξέταση δεν είναι παθογνωμικό κακοήθειας ή καλοήθειας και περαιτέρω διερεύνηση είναι απαραίτητη με επιλεγμένες απεικονιστικές εξετάσεις.

Απεικονιστική αξιολόγηση

Η υπερηχογραφία αποτελεί την πιο κοινή απεικονιστική εξέταση για να εκτιμηθεί μια μάζα των εξαρτημάτων. Αυτή μπορεί να διενεργηθεί είτε διακοιλιακά είτε διακολπικά. Η διακοιλιακή υπερηχογραφία απαιτεί μια πληρωμένη ουροδόχο κύστη σαν ακουστικό παράθυρο για την οπτικοποίηση των εξαρτημάτων. Αντιθέτως, η διακολπική υπερηχογραφία δεν έχει αυτήν την απαίτηση αλλά δεν είναι τόσο αποτελεσματική στην αξιολόγηση μιας μεγάλης εξαρτηματικής μάζας. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα υπερηχογραφικά ευρήματα που συνήθως χαρακτηρίζουν τις καλοήθειες και τις κακοήθειες μάζες ωοθηκών.

Υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τις καλοήθειες από τις κακοήθειες μάζες των εξαρτημάτων

<u>Καλοήθεια</u>	<u>Κακοήθεια</u>
Απλή κύστη < 10cm σε μέγεθος	Συμπαγής ή κυστική και συμπαγής
Διαφραγμάτια <3mm σε πάχος	Πολλαπλά διαφραγμάτια > 2-3cm σε μέγεθος
Μονόπλευρη	Αμφοτερόπλευρη
Ασβεστοποίηση	Ασκίτης
Διαστρωμάτωση των περιεχομένων στην κύστη ανάλογα με το βάρος τους	

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.

Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά συστήματα βαθμολόγησης και κατάταξης των υπερηχογραφικών αυτών ευρημάτων που περιλαμβάνουν το μέγεθος της ωοθήκης, τον αριθμό και το πάχος των διαφραγμάτων, την παρουσία θηλώδων προβολών και συμπαγών συστατικών. Η παραμονή των ίδιων υπερηχογραφικών ευρημάτων σ' έναν δεύτερο υπέρηχο μετά από 4-6 εβδομάδες συμβάλλει σημαντικά στην μείωση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα δεν υπάρχει ένα καθιερωμένο και κοινώς αποδεκτό σύστημα αξιολόγησης των εξαρτηματικών μαζών. Για αυτό το λόγο, η συσχέτιση των υπερηχογραφικής απεικόνισης με τα παθολογικά ευρήματα είναι απαραίτητη. Η έγχρωμη υπερηχογραφική απεικόνιση της ροής του αγγειακού δικτύου της εξαρτηματικής μάζας (Color flow Doppler) αυξάνει την ευαισθησία και ειδικότητα της υπερηχογραφίας ως μεθόδου διαχωρισμού των καλοήθων από τους κακοήθεις όγκους. Η αγγειογέννεση που συνοδεύει τις

κακοήθειες έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ροή αίματος και αγγειακές ανωμαλίες σε σχέση με την φυσιολογική αγγειακή αρχιτεκτονική και ροή αίματος που παρουσιάζουν οι καλοήθειες όγκοι. Ωστόσο το υπερηχογραφικό αυτό εύρημα δεν είναι σταθερό σε όλες τις μελέτες και το όφελος, αν υπάρχει, από την προσθήκη αυτής της εξέτασης στο υπερηχογράφημα είναι περιορισμένο (49).

Η απεικόνιση των εξαρτηματικών μαζών με την υπολογιστική τομογραφία (CT) και την μαγνητική τομογραφία (MRI), μπορεί να παράσχει κλινικά χρήσιμες πληροφορίες σε επιλεγμένες περιπτώσεις. Η υπολογιστική τομογραφία παρέχει πληροφορίες και για τις οπισθοπεριτοναϊκές δομές εκτός από την πύελο. Η μαγνητική τομογραφία μπορεί να παράσχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την φύση του νεοπλασματος της ωοθήκης. Εξαιτίας του υψηλού κόστους και του αμφισβητήσιμου οφέλους, αυτή η διαγνωστική προσέγγιση σπάνια χρησιμοποιείται σε όγκους ωοθηκών. Ωστόσο έχει μεγάλο όφελος σε έγκυες ασθενείς γιατί αποφεύγεται η έκθεση του εμβρύου στην ακτινοβολία.

Μια ασθενής που υποπτευόμαστε καρκίνο ωοθηκών πρέπει να πραγματοποιήσει και μια ακτινογραφία θώρακος για να αποκλειστεί η ύπαρξη μεταστατικής παρεγχυματικής νόσου ή πλευριτικής συλλογής. Εάν η ασθενής αναφέρει διαταραχές στις συνήθειες του εντέρου ή παρατηρείται αίμα κατά την εξέταση των κοπράνων τότε ο βαριούχος υποκλυσμός είναι απαραίτητος. Ασθενείς που πιστεύεται ότι πάσχουν από καρκίνο ωοθηκών καθώς εμφανίζουν μια οζώδη πυελική μάζα με ή χωρίς την παρουσία ασκίτη μπορεί στην πραγματικότητα να πάσχουν από καρκίνο του εντέρου. Εξαιτίας της γενετικής συσχέτισης ανάμεσα στον καρκίνο ωοθηκών, του εντέρου και του μαστού μια ασθενής που υποπτευόμαστε καρκίνο ωοθηκών θα πρέπει να πραγματοποιήσει και μια μαστογραφία.

Εργαστηριακή αξιολόγηση

Όποτε υποπτευόμαστε καρκίνο ωοθηκών, εργαστηριακός έλεγχος που περιλαμβάνει μια γενική αίματος καθώς και πλήρης βιοχημικός έλεγχος είναι απαραίτητος. Τα επίπεδα της χοριακής γοναδοτροπίνης στον ορό πρέπει να καταμετρώνται σε κάθε γυναίκα η οποία αντιμετωπίζει την πιθανότητα να είναι έγκυος. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα της άλφα φετοπρωτεΐνης (AFP) και της

γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) πρέπει να μετρώνται σε νεαρά κορίτσια και έφηβες που παρουσιάζουν μια εξαρτηματική μάζα εξαιτίας της μεγαλύτερης πιθανότητας να εμφανίσουν έναν κακοήγη όγκο γεννητικών κυττάρων. Τα επίπεδα του CA-125 στον ορό πρέπει επίσης να καθοριστούν όταν η κακοήθεια ωοθηκών περιλαμβάνεται στην διαφορική διάγνωση (50, 51). Αυξημένες τιμές σε μετεμνοπαυσιακές γυναίκες είναι ιδιαίτερα υποδηλωτικές κακοήθειας των ωοθηκών, αν και δεν είναι διαγνωστικές. Οι καρκίνοι του εντέρου, του μαστού, του παγκρέατος, του στομάχου, της μήτρας και των σαλπίνγων επίσης σχετίζονται με αυξημένες τιμές CA-125. Οι καλοήθεις καταστάσεις, που συχνότερα διαγιγνώσκονται σε νεότερες γυναίκες και περιλαμβάνουν την εγκυμοσύνη, την ενδομητρίωση, τα ινομώματα και την αδеноμύωση σχετίζονται και αυτές με αυξημένα επίπεδα CA-125 και περιορίζουν την χρησιμότητα αυτής της δοκιμασίας σε προεμνοπαυσιακές γυναίκες Ένα φυσιολογικό επίπεδο του CA-125 δεν αποκλείει την διάγνωση του καρκίνου ωοθηκών και σε καμία περίπτωση δεν αποτελεί λόγο να καθυστερήσει η επέμβαση (52). Όμως κατά την διάρκεια της μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών το CA-125 αποτελεί ένα χρήσιμο βαρόμετρο παρακολούθησης της ενεργότητας της νόσου, γιατί η σταδιακή πτώση του σχετίζεται με ανταπόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση ενώ σταδιακή αύξηση του με πρόοδο ή υποτροπή της νόσου (53, 54) .

Η παρακέντηση δεν αποτελεί μια εξέταση ρουτίνας σε μια ασθενή με ασκίτη και μια πυελική μάζα στην οποία έχει αποκλειστεί η ύπαρξη καρδιακής, νεφρικής και ηπατικής ανεπάρκειας. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορούν να εμφανιστούν στο 40% των γυναικών με εκτεταμένη ενδοπεριτοναϊκή νόσο. Σε αντίθεση με την περιτοναϊκή παρακέντηση , η παρακέντηση του θώρακα με σκοπό την λήψη περιτοναϊκού υγρού για κυτταρολογική εξέταση συστήνεται για λόγους σταδιοποίησης καθώς σε περίπτωση ύπαρξης κακοήθους πλευριτικού υγρού, η ασθενής κατατάσσεται στο στάδιο IV.

Τρόποι επέκτασης του καρκίνου των ωοθηκών

Γενικά, ο καρκίνος ωοθηκών μετατίθεται με αποβολίδαση κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα και περαιτέρω διηθητική ανάπτυξη των εμφυτεύσεων (55). Αρχικά, τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα όταν ο όγκος διηθεί την επιφάνεια της ωοθήκης. Ακολουθώντας την φυσιολογική κυκλοφορία του περιτοναϊκού υγρού, εμφυτεύσεις μπορούν να αναπτυχθούν οπουδήποτε στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του καρκίνου ωοθηκών είναι ότι οι μεταστατικές εστίες συνήθως δεν διηθούν τα σπλαχνικά όργανα αλλά αποτελούν επιφανειακές εμφυτεύσεις. Εξαιτίας της μεγάλης αγγειοβρίθειας του, το επίπλουν αποτελεί την πιο συχνή θέση εξάπλωσης και συχνά εμφανίζει εκτεταμένη προσβολή από την νόσο. Οζώδεις εστίες είναι συχνά παρούσες στην κατώτερη επιφάνεια του δεξιού ημιδιαφράγματος και στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου αλλά όλες οι ενδοπεριτοναϊκές επιφάνειες αντιμετωπίζουν κίνδυνο.

Η λεμφογενής διάδοση είναι ο άλλος πρωταρχικός τρόπος διασποράς. Τα καρκινικά κύτταρα ακολουθούν είτε την οδό της αγγείωσης των ωοθηκών που καταλήγει στους παραορτικούς λεμφαδένες στο ύψος των νεφρικών αγγείων είτε μέσω του πλατέος συνδέσμου στους πυελικούς λεμφαδένες (λαγονοθυρεοειδική περιοχή- έσω πλευρά της έξω λαγονίου αλύσου). Σπάνια οι μεταστάσεις επίσης ακολουθούν τον στρογγύλο σύνδεσμο στους μηροβουβωνικούς λεμφαδένες (56).

Η απευθείας επέκταση του προοδευτικά αυξανόμενου καρκίνου ωοθηκών κατά συνέχεια ιστού στα παρακείμενα όργανα περιλαμβάνει την μήτρα, τις σάλπιγγες και το ορθοσιγμοειδές. Συνήθως, αυτό σχετίζεται με σημαντική σκλήρυνση των παρακείμενων ιστών.

Σε προχωρημένη νόσο αρκετά λίτρα ασκτικής συλλογής μπορεί να εμφανιστούν. Αυτό πιστεύεται πως είναι αποτέλεσμα είτε της αυξημένης παραγωγής καρκινοματώδους υγρού είτε μειωμένης κάθαρσης λόγω απόφραξης των λεμφαγγείων. Παρομοίως, διαπερνώντας το διάφραγμα μπορεί να αναπτυχθεί μια κακοήθης πλευριτική συλλογή.

Η αιματογενής διασπορά δεν είναι τυπική. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μεταστάσεις στο ήπαρ ή στο πνευμονικό παρέγχυμα, στον εγκέφαλο ή στα νεφρά παρατηρούνται σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο και όχι στην αρχική διάγνωση.

Σταδιοποίηση

Ο καρκίνος ωοθηκών σταδιοποιείται χειρουργικά βασιζόμενοι στους τυπικούς τρόπους διασποράς του. Ακόμη και όταν ένας όγκος φαίνεται κλινικά να βρίσκεται περιορισμένος στην ωοθήκη, σε αρκετές περιπτώσεις κατά την επέμβαση παρατηρούνται ανιχνεύσιμες μεταστάσεις. Για αυτό το λόγο η ακριβής χειρουργική σταδιοποίηση είναι κρίσιμη για την ορθή θεραπευτική αντιμετώπιση. Περίπου μόνο το 1/3 των ασθενών έχουν στάδιο I ή II κατά FIGO. Η σταδιοποίηση του καρκίνου των ωοθηκών που χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα είναι το σύστημα σταδιοποίησης της διεθνούς ενώσεως Μαιευτικής και Γυναικολογίας FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) όπου χρησιμοποιούνται πληροφορίες που λαμβάνονται κατά την επέμβαση, η οποία περιλαμβάνει μια ολική κοιλιακή υστερεκτομή, την αφαίρεση συνήθως και των δύο ωοθηκών και σαλπίνγων, συνήθως του επιπλόου, καθώς και περιτοναϊκές πλύσεις για κυτταρολογική εξέταση. Το σύστημα σταδιοποίησης AJCC είναι ένα αντίστοιχο σύστημα σταδιοποίησης. Το σύστημα αυτό περιγράφει την έκταση του πρωτογενούς όγκου (T), την απουσία ή παρουσία μεταστάσεων σε περιοχικούς λεμφαδένες (N), και η απουσία ή παρουσία μακρινών Μεταστάσεων (M).

Σύστημα Σταδιοποίησης κατά FIGO

- Στάδιο I – η νόσος περιορίζεται σε μία ή και στις δύο ωοθήκες
 - IA - αφορά μια ωοθήκη. Άρρηκτη κάψα, χωρίς διήθηση της επιφάνειας των ωοθηκών, χωρίς εντόπιση κακοήθων κυττάρων σε ασκίτη ή στα περιτοναϊκά εκπλύματα
 - IB - αφορά και τις δυο ωοθήκες. Άρρηκτη κάψα, χωρίς διήθηση της επιφάνειας των ωοθηκών, χωρίς εντόπιση κακοήθων κυττάρων σε ασκίτη ή στα περιτοναϊκά εκπλύματα

- IC – Ο όγκος περιορίζεται στις ωοθήκες με οποιοδήποτε από τα ακόλουθα: ρήξη κάψας, διήθηση της επιφάνειας των ωοθηκών, ασκίτης ή θετική κυτταρολογική εκπλύματος περιτοναϊκής κοιλότητας.

- Στάδιο II - πυελική επέκταση ή εμφυτεύσεις
 - ΠΑ- επέκταση ή και μετάσταση στη μήτρα ή και στις σάλπιγγες Αρνητική κυτταρολογική εκπλυμάτων.
 - ΠΒ - επέκταση ή εμφυτεύσεις σε άλλα πυελικά όργανα. Αρνητική κυτταρολογική εκπλυμάτων.
 - ΠC - πυελική επέκταση ή εμφυτεύσεις με παρουσία ασκίτη ή θετική κυτταρολογική εκπλυμάτων περιτοναϊκής κοιλότητας.

- Στάδιο III – Εντόπιση στη μια ή και στις δύο ωοθήκες με περιτοναϊκές διηθήσεις εκτός πυέλου ή θετικούς οπισθοπεριτοναϊκούς ή/και λαγόνιους λεμφαδένες. Επιφανειακές διηθήσεις ήπατος. Ή περιορισμένη στην πύελο με επέκταση στο λεπτό έντερο ή επίπλουν
 - ΠΙΑ - μικροσκοπικές περιτοναϊκές μεταστάσεις πέραν της πυέλου. Αρνητικοί λεμφαδένες
 - ΠΙΒ - μακροσκοπικά περιτοναϊκές μεταστάσεις πέραν της πυέλου ή και επιπλόου μικρότερες από 2 cm σε μέγεθος
 - ΠΙC - περιτοναϊκές μεταστάσεις πέραν της πυέλου ή και επιπλόου > 2 cm ή μεταστάσεις οπισθοπεριτοναϊκών ή λαγονίων λεμφαδένων

- Στάδιο IV - απομακρυσμένες μεταστάσεις (περιλαμβάνονται παρεγχυματικές μεταστάσεις ήπατος και πλευριτικό υγρό με θετική κυτταρολογική.)

Παραορτικές λεμφαδενικές μεταστάσεις θεωρούνται μεταστάσεις σε τοπικούς λεμφαδένες (στάδιο ΠΙC). Δεδομένου ότι υπάρχει μόνο ένας παρα-αορτικός λεμφαδένας που παρεμβαίνει μέχρι τον θωρακικού πόρο στη δεξιά πλευρά του σώματος, ο καρκίνος των ωοθηκών μπορεί να εξαπλωθεί γρήγορα σε μακρινές εστίες όπως ο πνεύμονας.

Το σύστημα σταδιοποίησης AJCC / TNM περιλαμβάνει τρεις κατηγοριοποιήσεις για τον καρκίνο των ωοθηκών, T, N και M. Η κατηγορία T

περιέχει τρεις άλλες υποκατηγορίες, T1, T2 και T3, η καθεμιά από τις οποίες σχετίζεται με την εστία όπου έχει αναπτυχθεί ο όγκος (σε μια ή και στις δύο ωοθήκες, μέσα ή έξω από την ωοθήκη). Η T1 κατηγορία του καρκίνου των ωοθηκών περιγράφει όγκους των ωοθηκών που περιορίζονται στις ωοθήκες, και οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν την μια ή και τις δύο. Η υποκατηγορία T1a χρησιμοποιείται για το στάδιο του καρκίνου που βρίσκεται μόνο σε μία ωοθήκη, με άθικτη την κάψα και αρνητική κυτταρολογική των περιτοναϊκών εκπλυμάτων. Όταν ο καρκίνος δεν επηρεάζει την κάψα αλλά περιορίζεται στο εσωτερικό και των δύο ωοθηκών και είναι αρνητική η κυτταρολογική εξέταση των περιτοναϊκών εκπλυμάτων τότε σταδιοποιείται ως T1b. Η T1c κατηγορία περιγράφει ένα είδος όγκου που μπορεί να επηρεάσει την μια ή και τις δύο ωοθήκες, ο οποίος διηθεί την κάψα της ωοθήκης ή είναι θετική η κυτταρολογική εξέταση των περιτοναϊκών εκπλυμάτων. Η T2 κατηγορία περιγράφει ένα πιο προχωρημένο στάδιο του καρκίνου. Στην περίπτωση αυτή, ο όγκος έχει αναπτυχθεί σε μία ή και στις δύο ωοθήκες και έχει εξαπλωθεί στην μήτρα, στις σάλπιγγες σε άλλους ιστούς της πυέλου. Το στάδιο T2a χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα καρκινικό όγκο που έχει εξαπλωθεί στη μήτρα ή στις σάλπιγγες (ή και στα δύο), αλλά με αρνητική την κυτταρολογική εξέταση των περιτοναϊκών εκπλυμάτων. Τα στάδια T2b και T2c δείχνουν καρκίνο με μεταστάσεις σε άλλα όργανα της πυέλου εκτός της μήτρας και των σαλπίγγων με αρνητική ή θετική την κυτταρολογική εξέταση των περιτοναϊκών εκπλυμάτων αντίστοιχα. Το T3 είναι το στάδιο που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον καρκίνο που έχει εξαπλωθεί εκτός της πυέλου. Το στάδιο αυτό παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος της μεταστατικού όγκου. Οι όγκοι αυτοί μπορεί να είναι πολύ μικροί, ορατοί μόνο με το μικροσκόπιο (T3a), ορατοί αλλά όχι μεγαλύτεροι από 2 εκατοστά (T3b) και μεγαλύτεροι από 2 εκατοστά (T3c).

Αυτό το σύστημα σταδιοποίησης χρησιμοποιεί επίσης τις κατηγορίες N για να περιγράψει καρκίνους που έχουν ή δεν έχουν εξαπλωθεί στους περιοχικούς λεμφαδένες. Υπάρχουν δύο μόνο κατηγορίες N, N0 που αναφέρεται σε καρκινικούς όγκους που δεν έχουν επηρεάσει τους περιοχικούς λεμφαδένες, και N1, όπου υπάρχει προσβολή των λεμφαδένων από τον όγκο.

Οι κατηγορίες M στο σύστημα σταδιοποίησης AJCC / TNM παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το κατά πόσον ο καρκίνος των ωοθηκών έχει δώσει μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα όπως το ήπαρ ή οι πνεύμονες. Η κατηγορία

M0 υποδεικνύει ότι ο καρκίνος δεν είχε εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα όργανα και η κατηγορία M1 χρησιμοποιείται για τον καρκίνο που έχει εξαπλωθεί σε άλλα όργανα του σώματος.

Το σύστημα σταδιοποίησης AJCC / TNM περιέχει επίσης τις υποκατηγορίες T_x και N_x που υποδείκνυουν πως η έκταση του όγκου δεν μπορεί να χαρακτηριστεί, λόγω των ανεπαρκών δεδομένων, ή η συμμετοχή των περιοχικών λεμφαδένων δεν μπορεί να χαρακτηριστεί, για τον ίδιο λόγο, αντίστοιχα.

Τα στάδια του καρκίνου των ωοθηκών κατά FIGO αντιστοιχούν στις κατηγορίες του συστήματος TNM ως εξής:

- Στάδιο I: T1 + N0 + M0
 - IA: T1a + N0 + M0
 - IB: T1b + N0 + M0
 - IC: T1c + N0 + M0
- Στάδιο II: T2 + N0 + M0
 - IIa: T2a + N0 + M0
 - IIb: T2b + N0 + M0
 - IIc: T2c + N0 + M0
- Στάδιο III: T3 + N0 + M0
 - IIIA: T3a + N0 + M0
 - IIIB: T3b + N0 + M0
 - IIIC: T3c + N0 + M0 ή T + N1 + M0
- Στάδιο IV: Οποιοδήποτε T + Οποιοδήποτε N + M1

Ο καρκίνος των ωοθηκών, όπως και κάθε άλλο είδος καρκίνου, επίσης αξιολογείται ως προς τον βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων (grading), εκτός από την σταδιοποίηση του όγκου. Ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης ενός όγκου εξετάζει πόσο άτυπα ή κακοήγη εμφανίζονται τα κύτταρα που τον αποτελούν κατά την μικροσκοπική εξέταση. Υπάρχουν τέσσερις βαθμοί διαφοροποίησης που υποδεικνύουν την πιθανότητα εξάπλωσης της νόσου και όσο υψηλότερος είναι ο βαθμός αυτός, τόσο περισσότερες πιθανότητες υπάρχουν για να συμβεί αυτό. Ο βαθμός 0 χρησιμοποιείται για να περιγράψει μη επιθετικούς όγκους. Οι καρκίνοι με

αυτόν το βαθμό διαφοροποίησης αναφέρονται επίσης ως όγκοι οριακής κακοήθειας. Οι όγκοι με βαθμό διαφοροποίησης 1 έχουν κύτταρα που είναι καλά διαφοροποιημένα (μοιάζουν πολύ με τον φυσιολογικό ιστό) και είναι αυτοί με την καλύτερη πρόγνωση. Οι όγκοι με βαθμό διαφοροποίησης 2 , ονομάζονται επίσης όγκοι μέτριας διαφοροποίησης και είναι κατασκευασμένοι από κύτταρα που μοιάζουν με τον φυσιολογικό ιστό. Οι όγκοι βαθμού διαφοροποίησης 3 έχουν τη χειρότερη πρόγνωση και τα κύτταρα τους είναι άτυπα, αναφέρονται επίσης ως όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης.

Θεραπευτική αντιμετώπιση

➤ Χειρουργική αντιμετώπιση

Η εγχείρηση αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιμετώπισης του καρκίνου ωοθηκών ανεξάρτητα από τον βαθμό διαφοροποίησης ή το στάδιο της νόσου. Όποτε ο καρκίνος ωοθηκών θεωρείται μια πιθανή διάγνωση, πάντοτε θα πρέπει να αναζητείται η συμβουλή ενός γυναικολόγου ογκολόγου καθώς και η συμβολή του τόσο στην αξιολόγηση της κατάστασης καθώς και στην επακόλουθη θεραπευτική αντιμετώπιση της ασθενούς. Ο γυναικολόγος ογκολόγος είναι εκπαιδευμένος να αντιμετωπίζει τόσο τις χειρουργικές όσο και τις υπόλοιπες θεραπευτικές ανάγκες τις ασθενούς.

Κατά την διάρκεια της επέμβασης αρκετά χαρακτηριστικά έχουν περιγραφεί που συμβάλουν στον διαχωρισμό των καλοήθων από τις κακοήθεις εξαρτηματικές μάζες όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (57).

Διεγχειρητική διαφοροποίηση των καλοήθων από τις κακοήθεις
μάζες

Καλοήθεια	Κακοήθεια
Μονόπλευρη	Αμφοτερόπλευρη
Μη προσκολλημένη	Προσκολλημένες
Απλή κύστη	Πολύχωρη μάζα
Άρρηκτη κάψα	Ρήξη της κάψας
Λείες επιφάνειες	Θηλώδεις αποφύσεις
	Ασκίτης
	Περιοχές αιμορραγίας ή νέκρωσης
	Αμιγείς, συμπαγείς περιοχές

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.

Ωστόσο η αδρή εξέταση της μάζας σε καμία περίπτωση δεν υποκαθιστά την ιστολογική, παθολογοανατομική ανάλυση. Κάθε φορά που η ιστολογική σύνθεση μιας πυελικής ή εξαρτηματικής μάζας δεν είναι γνωστή, πρέπει να ζητείται μια κυτταρολογική παθολογοανατομική εξέταση. Η πιθανότητα ψευδώς αρνητικής ή ψευδώς θετικής απάντησης είναι μικρότερη από 5%, όταν η εξέταση διενεργείται από έναν έμπειρο παθολογοανατόμο. Οι ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο ωοθηκών υπόκειται χειρουργική επέμβαση τόσο για να πραγματοποιηθεί η σταδιοποίηση της νόσου και να εκτιμηθεί η διασπορά όσο για να επιτευχθεί μείωση ή δυνατόν εξάλειψη της νόσου. Η εξαίρεση του πρωταρχικού όγκου καθώς και των μεταστάσεων του αναφέρεται ως επέμβαση ογκομείωσης (tumor debulking ή cytoreductive surgery). Σε αρχικό στάδιο της νόσου, όταν η διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας της

γυναίκας είναι το ζητούμενο, το ενδεχόμενο αφαίρεσης μόνο του εμπλεκόμενου εξαρτήματος θα πρέπει να εξετάζεται.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πλήρης έκταση της νόσου θα πρέπει να αναζητείται και να τεκμηριώνεται μέσω βιοψιών καθώς αυτό θα καθορίσει και την μετέπειτα θεραπευτική αντιμετώπιση. Κατά την στιγμή της διάγνωσης, περισσότερο από το 70% των γυναικών που πάσχουν από επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών φέρουν εντοπισμένες μεταστάσεις πέραν της πυέλου. Οι πιο συχνές θέσεις μετάστασης είναι το περιτόναιο (85%), το επίπλου (70%), το ήπαρ (35%), τα πλευρά (33%), ο πνεύμονας (25%) και τα οστά (15%). Μεταστάσεις στους περιοχικούς λεμφαδένες συμβαίνουν συχνά, που στο 80% των περιπτώσεων αφορούν τους πυελικούς λεμφαδένες και στο 67% τους παραορτικούς λεμφαδένες ανάλογα με το στάδιο της νόσου.

Οι πληροφορίες που αποκτώνται κατά την σταδιοποίηση της νόσου καθορίζουν την πρόγνωση και επηρεάζουν τις αποφάσεις για την επακόλουθη θεραπεία. Η χειρουργική σταδιοποίηση απαιτεί τεκμηρίωση του πρωτοπαθούς νεοπλασματος και καθορισμό της έκτασης της νόσου με ενδελεχή εξέταση, λήψη βιοψιών από τις περιτοναϊκές και ενδοκοιλιακές εστίες κακοήθειας καθώς και βιοψία των οπισθοπεριτοναϊκών λεμφαδένων. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα βήματα που ακολουθούνται κατά την χειρουργική σταδιοποίηση του καρκίνου ωοθηκών. Σε κάθε περίπτωση οποιοδήποτε υγρό εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας πρέπει να αναρροφάται. Εάν δεν υπάρχει ελεύθερο ακιτικό υγρό, τότε διενεργούμε περιτοναϊκές πλύσεις, χρησιμοποιώντας 50-100 ml φυσιολογικού ορού που ενσταλάζονται στην δεξιά και αριστερή παρακολική αύλακα, στο πυελικό έδαφος καθώς και κάτω από κάθε ημιδιάφραγμα. Το υγρό αυτό στην συνέχεια συλλέγεται και αποστέλλεται προς ιστολογική ανάλυση. Η ολοκληρωμένη χειρουργική σταδιοποίηση του καρκίνου ωοθηκών απαιτεί την βιοψία των πυελικών και παραορτικών λεμφαδένων. Είναι σημαντικό να κατανοηθεί πως η ψηλάφηση των οπισθοπεριτοναϊκών λεμφαδένων σε καμιά περίπτωση δεν αποκαθιστά την βιοψία και ιστολογική ανάλυση.

Χειρουργική σταδιοποίηση καρκίνου ωοθηκών.

1. Λήψη ασκитικού υγρού ή κυτταρολογικού εκπλύματος από τις παρακολικές αύλακες, το έδαφος της πυέλου καθώς και τα υποδιαφράγματα για κυτταρολογική εξέταση.
2. Συστηματικός έλεγχος της περιτοναϊκής κοιλότητας (επιφάνεια περιτοναίου – όργανα).
3. Αφαίρεση ακέραιου του όγκου.
4. Υστερεκτομή
5. Επιπλεκτομή
6. Βιοψίες των περιτοναϊκών εμφυτεύσεων. Αν δεν ανευρίσκονται εμφανείς εμφυτεύσεις, λαμβάνονται τυχαίες βιοψίες από τις παρακολικές αύλακες , το τοιχωματικό περιτόναιο και την δεξιά υποδιαφραγματική περιτοναϊκή επιφάνεια.
7. Λεμφαδενεκτομία πυελικών και παραορτικών λεμφαδένων.
8. Ογκομειωτική επέμβαση με σκοπό να απομακρυνθεί κάθε ορατή εστία της νόσου.

Γενικά, αμφότερα τα εξαρτήματα πρέπει να αφαιρούνται ακόμη και όταν τα αδρά χαρακτηριστικά τους είναι φυσιολογικά. Συχνά αποτελούν εστίες μη εμφανούς μεταστατικής νόσου και υπάρχει σημαντικός κίνδυνος υποτροπής. Εξαίρεση σ' αυτή την παραδοχή μπορούν να αποτελέσουν μόνο νέες γυναίκες με διαφανόμενο επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών πρώτου σταδίου. Στην περίπτωση που υπάρχει ισχυρή επιθυμία διατήρησης της γονιμότητας και η ασθενής έχει ενημερωθεί πλήρως για τον αυξημένο κίνδυνο υποτροπής αυτή η συντηρητικότερη χειρουργική προσέγγιση μπορεί να επιλεγθεί. Ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός διαφοροποίησης του νεοπλάσματος καθώς και τα ευρήματα κατά την στιγμή της επέμβασης θα πρέπει να καθορίζουν την απόφαση. Καλά διαφοροποιημένα, σταδίου I νεοπλάσματα σχετίζονται με πολύ καλύτερο δείκτη πενταετούς επιβίωσης από μετρίως ή φτωχώς

διαφοροποίησης κακοήθειες. Τα βλεννώδη και ενδομητριοειδή νεοπλάσματα σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση από τα ορώδη και διαυγοκυτταρικά νεοπλάσματα της ωοθήκης. Εάν η ταχεία βιοψία που λαμβάνεται κατά την διάρκεια της εγχείρησης δεν καταδεικνύει αξιόπιστα κακοήθεια, η έκτασης της επεμβάσεως πρέπει να είναι περιορισμένη μέχρι την τελική παθολογοανατομική απάντηση.

Η υστερεκτομή διενεργείται γιατί η μήτρα αποτελεί συχνή μεταστατική εστία κατά την εξέλιξη της νόσου. Υπάρχει επίσης κίνδυνος σύγχρονου καρκίνου του ενδομητρίου στις ασθενείς με ενδομητριοειδή καρκίνο των ωοθηκών. Επιπλέον, η αφαίρεση της μήτρας διευκολύνει τις εξετάσεις παρακολούθησης των ασθενών που θα ακολουθήσουν και προλαμβάνουν προβλήματα πιθανούς δευτεροπαθούς κολπικής αιμορραγίας που συχνά προκύπτουν.

Η ολική επιπλεκτομή προτείνεται ακόμη και όταν δεν αναγνωρίζεται αδρή εμφάνιση της νόσου μια και αποτελεί συχνή εστία μικροσκοπικής μετάστασης. Η αφαίρεση του επιπλόου διευκολύνει την διασπορά των ενδοπεριτοναϊκών παραγόντων, μειώνει τον βαθμό συγκέντρωσης της ασκτικής συλλογής μετεγχειρητικά και ίσως αποτελεί και μια παρηγορητική αγωγή στις ασθενείς που φέρουν μεταστάσεις στο επίπλου.

Η ογκομείωση πρέπει πάντοτε να επιχειρείται όταν είναι εφικτή. Η λογική αυτή της επιθετικής αντιμετώπισης κάθε ορατής εστίας κακοήθειας βασίζεται σε τρεις κύριους λόγους. Αρχικά, η απομάκρυνση της καρκινικής μάζας συχνά ανακουφίζει από συμπτώματα που αφορούν το γαστρεντερικό και βελτιώνει την διατροφική κατάσταση της ασθενούς. Η δραστική ογκομείωση, επίσης ευνοεί την συνολική θεραπευτική αντιμετώπιση μιας και οι μεγάλοι σε μέγεθος όγκοι συνήθως έχουν πολλή φτωχή αγγείωση και οξυγόνωση και για αυτό το λόγο εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στην στη χήμειο- και άκτινο- θεραπεία (58). Επιπλέον, οι μεγάλοι σε μέγεθος όγκοι περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων που βρίσκονται στην φάση ανάπαυσης του κυτταρικού κύκλου. Τελειώνοντας είναι γνωστό ότι αρκετές μορφές καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου ωοθηκών παράγουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες που παρεμποδίζουν την απάντηση του ανοσοποιητικού εναντίον του όγκου, αναστέλλοντας την παραγωγή κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων.

Οι περιτοναϊκές εμφυτεύσεις πρέπει πάντοτε να στέλνονται προς βιοψία ώστε να επιβεβαιώνεται και ιστολογικά η κλινική διαπίστωση της μεταστατικής νόσου. Η διαφορική διάγνωση των περιτοναϊκών εμφυτεύσεων περιλαμβάνει την ενδομητρίωση, την φυματιώδη περιτονίτιδα ή και κοκκιώματα. Οζώδης σκληρές στην υφή ή άλλες ύποπτες περιοχές πρέπει επίσης να λαμβάνονται προς βιοψία.

Οι ενδείξεις μιας νέας επέμβασης σε ασθενείς με εμμένοντα καρκίνο ωοθηκών απαιτεί εξατομίκευση και δύσκολη χειρουργική κρίση. Η αφαίρεση του όγκου μετά από την πρώτη επέμβαση ονομάζεται δευτερογενής κυτταρομειωτική επέμβαση (secondary cytoreductive surgery) και έχει συγκεκριμένα πραγματικά πλεονεκτήματα (59). Αυτές οι επεμβάσεις πραγματοποιούνται σε επιλεγμένες ασθενείς στις οποίες η εκτομή του όγκου ίσως επιμηκύνει το προσδόκιμο επιβίωσης μειώνοντας τις εστίες κακοήθειας σε μέγεθος λιγότερο από 5 χιλιοστά ή ανακουφίζει από σημαντικά συμπτώματα όπως την απόφραξη του γαστρεντερικού. Οι ασθενείς στις οποίες επιτυγχάνεται πλήρης εκτομή του όγκου κατά την δεύτερη αυτή επέμβαση έχουν πολλή καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τις ασθενείς όπου επετεύχθηκε μικρότερη ογκομείωση.

Αρκετές ασθενείς ωστόσο, δεν υφίστανται αρχικά την χειρουργική επέμβαση ενδεδειγμένης εκτομής του όγκου (60). Σε κάποιες περιπτώσεις η απεικονιστική εικόνα περιγράφει ανεγχείρητη νόσο. Άλλες ασθενείς έχουν μεγάλη ποσοστό υπολειπόμενης νόσου είτε επειδή δεν αντιμετωπίστηκαν αρχικά από έναν γυναικολόγο ογκολόγο είτε γιατί παρά την προσπάθεια για εκρίζωση κάθε ορατής εστίας κάτι τέτοιο δεν κατέστη δυνατό. Σ'αυτές τις περιπτώσεις μια «ενδιάμεση» ογκομειωτική επέμβαση (interval cytoreductive surgery) ίσως αποτελεί την ενδεδειγμένη αντιμετώπιση μετά από 3 με 4 κύκλους χημειοθεραπείας που θα έχουν συρρικνώσει τον όγκο (61).

➤ Χημειοθεραπεία

Η πρόγνωση των γυναικών με νόσο σταδίου I ή II είναι καλύτερη από αυτών με προχωρημένη νόσο. Παρ' όλ' αυτά, σε ένα ποσοστό 20-30% ασθενείς θα υποτροπιάσουν και θα καταλήξουν από την νόσο τους (62). Για την μείωση αυτών των πιθανοτήτων έχει χρησιμοποιηθεί η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία, η οποία χορηγείται μετά από επιλογή των ασθενών ανάλογα με τον κίνδυνο υποτροπής. Στις ασθενείς που εμφανίζουν νόσο σταδίου Ia και καλής διαφοροποίησης, η χημειοθεραπεία που ακολουθεί την αρχική χειρουργική αντιμετώπιση δεν επηρεάζει την επιβίωση (63). Για αυτό το λόγο αυτή η ομάδα ασθενών εάν επιλεγθεί σωστά, δεν απαιτεί χημειοθεραπεία. Κατά γενικό κανόνα όλες οι ασθενείς εκτός του σταδίου Ia και καλής διαφοροποίησης θα πρέπει να λάβουν χημειοθεραπεία. Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ένα χημειοευαίσθητο νεόπλασμα και αρκετοί παράγοντες έχουν δείξει δραστικότητα στην προχωρημένη νόσο. Οι συνδυασμένες θεραπείες έχουν δείξει να υπερτερούν των θεραπειών ενός παράγοντα.

Αυτή τη στιγμή, ο πιο δραστικός συνδυασμός χημειοθεραπείας επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών, θεωρείται ο συνδυασμός πακλιταξέλης και καρβοπλατίνης (64, 65). Ο συνδυασμός αυτός αντικατέστησε την προηγούμενη θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη και σισπλατίνη γιατί επέδειξε καλύτερα αποτελέσματα σε μεγάλο αριθμό κλινικών δοκιμών (66, 67, 68). Το τυπικό σχήμα αν και υπάρχουν και διαφοροποιήσεις περιλαμβάνει την συστηματική χορήγηση καρβοπλατίνης και πακλιταξέλης για 6 κύκλους με μεσοδιαστήματα 3 εβδομάδων (69, 70). Η ενδεχόμενη κυτταροτοξικότητα αυτής θεραπείας περιλαμβάνει ναυτία, εμέτους, διάρροια, αλωπεκία, νευροτοξικότητα και μυελοκαταστολή.

Τα ανάλογα πλατίνης, η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη είναι πολύ δραστικοί παράγοντες έναντι του επιθηλιακού ωοθηκικού καρκίνου. Η πλατίνη σχηματίζει ενδοκλωνικές ενώσεις προσθήκης με το DNA. Άμεσο αποτέλεσμα της δημιουργίας αυτών των ενώσεων είναι η αποδιοργάνωση της κανονικής διάταξης των βάσεων του μορίου και η παραμόρφωση του, που το καθιστά μη λειτουργικό, με επακόλουθο τον θάνατο του κυττάρου. Η καρβοπλατίνη είναι ένα παράγωγο της πλατίνης δεύτερης γενιάς που εμφανίζει κλινική δραστικότητα και δείκτες επιβίωσης παρόμοιους με την σισπλατίνη όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την πακλιταξέλη (71, 72). Ωστόσο, η συχνότητα των παρενεργειών από το γαστρεντερικό

όπως και η νευροτοξικότητα που σχετίζεται με την καρβοπλατίνη βρέθηκαν χαμηλότερες σε σύγκριση με την σισπλατίνη.

Οι ταξάνες (πακλιταξέλη και δοσιταξέλη) έχουν επίσης ισχυρή δραστηριότητα έναντι του ωθηκικού καρκίνου ακόμη και σε γυναίκες με πλατινοανθεκτικό καρκίνο που έχουν λάβει ήδη άλλες γραμμές χημειοθεραπείας. Η πακλιταξέλη, η παλαιότερη ταξάνη είναι ένας αντιμικροσωληνιακός παράγοντας που τροποποιεί την ισορροπία του καρκινικού κυττάρου προς την κατεύθυνση της συσσώρευσης των μικροσωληναρίων και σταθεροποιεί τον σχηματισμό των πολυμερών της τομπουλίνης, διακόπτοντας τη συνήθη αναδιαμόρφωση του μικροσωληνιακού δικτύου, η οποία είναι απαραίτητη για τη μεσόφαση και τη μίτωση.

Δε φαίνεται να υπάρχει όφελος στην επιβίωση από την προσθήκη και τρίτου, χωρίς διασταυρούμενη αντοχή παράγοντα (π.χ. γεμισιταβίνη, δοξορουβικίνη, επιρουμπικίνη, τοποτεκάνη, ιντερφερόνη- γ) στο σχήμα πακλιταξέλη-καρβοπλατίνη (68, 73). Στην κλινική πράξη συνήθως προτιμάται η χορήγηση πακλιταξέλης $175\text{mg}/\text{m}^2$ σε 3ωρη έγχυση και καρβοπλατίνης 6-7.5 AUC (area under the curve= επιφάνεια κάτωθεν της καμπύλης) κάθε 3 εβδομάδες για 6 κύκλους. Παράταση πέραν των 6 κύκλων δεν έχει δείξει όφελος στην επιβίωση παρά επαύξηση της τοξικότητας. Ιδανικά η χημειοθεραπεία θα πρέπει να ξεκινά 4-6 εβδομάδες από την επέμβαση, αφού η ασθενής έχει αναρρώσει πλήρως από το χειρουργείο.

Εξαιτίας του ιδιαίτερου τρόπου διασποράς της νόσου ο κύριος όγκος αυτής βρίσκεται εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας. Η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (IP intraperitoneal) χημειοθεραπείας επιτρέπει μια τοπική αύξηση της συγκέντρωσης των φαρμάκων εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας έως και επτά φορές σε σύγκριση με τη συστηματική χορήγηση, ενώ αποτρέπεται και η έκθεση υγιών οργάνων όπως ο μυελός των οστών, σε μεγάλες δόσεις χημειοθεραπευτικών. Ωστόσο φαίνεται να έχει όφελος μόνο σε ασθενείς σταδίου III με βέλτιστη ογκομείωση (<1cm) και εφόσον έχουν καλή γενική κατάσταση σε συνδυασμό πάντοτε με την ενδοφλέβια χημειοθεραπεία και με τίμημα όμως προς το παρόν την αυξημένη τοξικότητα (74, 75).

Η εκτίμηση της απάντησης των χημειοθεραπευτικών σχημάτων βασίζεται στην φυσική εξέταση, στις αλλαγές στο μέγεθος των κακοήθων εστιών κατά την

ψηλάφηση ή κατά την απεικονιστική αξιολόγηση καθώς στις αλλαγές στα επίπεδα του δείκτη CA-125. Αν και τα προεγχειρητικά επίπεδα του CA-125 δεν σχετίζονται με την έκταση του όγκου, οι αλλαγές στα μετεγχειρητικά επίπεδα του δείκτη φαίνεται να έχουν προγνωστική σημασία. Τα αυξημένα επίπεδα του CA-125 (>35%) σχετίζονται με την εύρεση επίμονης νόσου κατά την δεύτερη διερευνητική επέμβαση (second look surgery) κατά 97%. Το CA-125 στον ορό μπορεί να αυξάνει 3-6 μήνες πριν την εκδήλωση νόσου (76). Ωστόσο, τα φυσιολογικά επίπεδα του CA-125 δεν αποκλείουν τελείως την πιθανότητα υπολειπόμενης υποκλινικής νόσου.

Δυστυχώς, οι περισσότερες ασθενείς αναπτύσσουν αντίσταση στα παράγωγα της πλατίνης κατά την διάρκεια της θεραπείας. Η χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών σπάνια επιφέρει πλήρη ίαση αν και μια σημαντική επιμήκυνση της επιβίωσης επιτυγχάνεται σε κάποιες περιπτώσεις. Η απάντηση των ασθενών σε μια δεύτερη θεραπεία που βασίζεται και πάλι σε παράγωγα της πλατίνης εξαρτάται από το χρονικό διάστημα που παρεμβάλλεται από την ολοκλήρωση της αρχικής θεραπείας και την υποτροπή της νόσου. Όσο μεγαλύτερο είναι αυτό το διάστημα τόσο πιθανότερο είναι η δεύτερη θεραπεία να επιφέρει μια ικανοποιητική απάντηση (77).

Γενικά οι ασθενείς που φέρουν όγκους ευαίσθητους στην θεραπεία με πλατίνη ή πακλιταξέλη όπως επέδειξαν στην κλινική απάντηση στην αρχική θεραπεία, πιθανότατα θα επωφεληθούν εάν κατά την επαναληπτική θεραπεία λάβουν και πάλι παράγωγα της πλατίνης ή της πακλιταξέλης (78, 79, 80).

Πρόγνωση

Η πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Ωστόσο, το ποσοστό 5-ετής επιβίωσης των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών όλων των σταδίων είναι 50%. Πολύ χαμηλότερο από αυτό του καρκίνου ενδομητρίου (80%) και του τραχήλου της μήτρας (70%). Ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την επιβίωση είναι το στάδιο της νόσου αλλά η επιβίωση επίσης εξαρτάται από την ηλικία της ασθενούς. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι γυναίκες με ηλικία μικρότερη των 65 ετών έχουν διπλάσια πιθανότητα να επιβιώσουν 5 έτη μετά την αρχική διάγνωση σε σχέση με τις μεγαλύτερες. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός πως οι ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA έχουν καλύτερη πρόγνωση κυρίως λόγω της αυξημένης ευαισθησίας που παρουσιάζουν στα παράγωγα της πλατίνης (81).

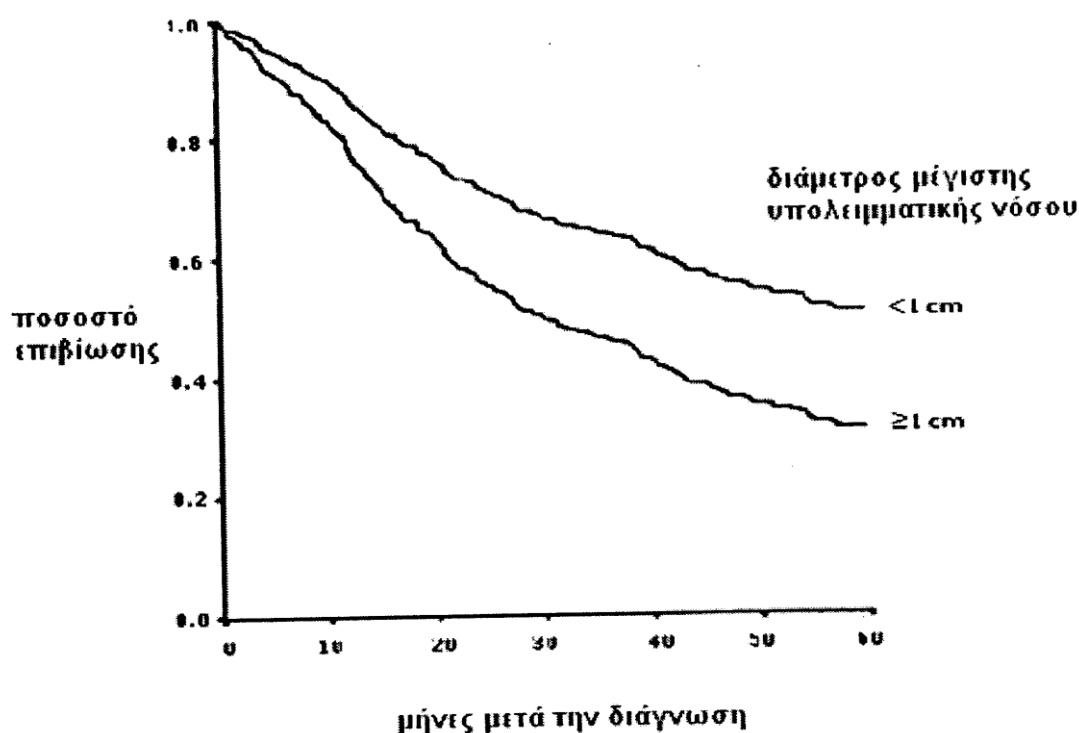
Ειδικότερα, οι κυριότεροι προγνωστικοί παράγοντες στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών είναι το στάδιο κατά FIGO και η υπολειπόμενη νόσος μετά την αρχική ογκομειωτική επέμβαση. Εκτός από αυτούς τους δύο, προγνωστικοί παράγοντες είναι η ηλικία της ασθενούς, η γενική της εικόνα (performance status, PS) και ο ιστολογικός τύπος της κακοήθειας (82). Η 5-ετής επιβίωση του καρκίνου των ωοθηκών είναι σήμερα 16% υψηλότερη από ότι ήταν στην περίοδο πριν το 1980 (10). Αυτή η σημαντική βελτίωση οφείλεται στην καλύτερη χειρουργική θεραπεία και χημειοθεραπεία με ανάλογο πλατίνης και ταξάνη και αφετέρου στον σαφέστερο ορισμό των σταδίων. Τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης σε ασθενείς με αρχικά στάδια της νόσου (I ή II) μπορούν να φθάσουν το 80-90%, ενώ ασθενείς με προχωρημένη νόσο (III ή IV) έχουν ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης μόνο 10-30% (83). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η επιβίωση των ασθενών σύμφωνα με την ετήσια αναφορά για τα έτη 1996-1998 του Διεθνούς οργανισμού Μαιευτικής και Γυναικολογίας (ΠΙΝΑΚΑΣ 6).

Στάδιο κατά FIGO	Αριθμός ασθενών	Συνολική επιβίωση (%)		
		1 έτος	2 έτη	5 έτη
Ia	467	98.5	97.8	89.4
Ib	58	94.7	85.8	84.8
Ic	560	96.2	89.9	78.2
IIa	73	93.1	88.9	79.2
IIb	105	91.4	82.7	64.3
IIc	206	92.1	83.9	68.2
IIIa	120	86.6	76.1	49.2
IIIb	251	86.1	65.5	40.8
IIIc	1653	81.5	61.1	28.9
IV	511	64.7	39.3	13.4

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Επιβίωση ανά στάδιο κατά FIGO ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (10).

Σε μια εποχή όπου η συνδυαστική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα/ταξάνη είναι ο χρυσός κανόνας για την χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών η υπολειπόμενη νόσος είναι ένας από τους πλέον ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες (84, 85, 86, 87). Η βέλτιστη ογκομείωση έχει εξαιρετική σημασία όπως φαίνεται και το διάγραμμα που ακολουθεί από την μελέτη του κυρίου Tingulstad και των συνεργατών του (ΕΙΚΟΝΑ 5) Από παλαιότερες μελέτες που συνέκριναν ασθενείς με βέλτιστη και μη βέλτιστη ογκομείωση που έλαβαν θεραπεία με πλατίνα/ταξάνη, το ελεύθερο νόσου διάστημα ήταν 22 μήνες και η συνολική επιβίωση 52 μήνες στην πρώτη περίπτωση έναντι 14 και 26 μηνών αντίστοιχα στην δεύτερη (88, 89). Νεότερες μελέτες, μάλιστα, αναδεικνύουν την σημαντικότητα της πλήρους ογκομείωσης, σε επίπεδα μικροσκοπικής (μακροσκοπικώς μη ορατής υπολειπόμενης νόσου, $\leq 1\text{mm}$) στην πρόγνωση. Στην μελέτη του κυρίου Chi και των συνεργατών οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε βέλτιστη ογκομείωση ($\leq 1\text{cm}$) εμφάνισαν σημαντικά μικρότερη

συνολική επιβίωση από αυτές που υποβλήθηκαν σε πλήρη ογκομείωση ($\leq 1\text{mm}$) (90). Επίσης και το ποσοστό υποτροπής επηρεάζεται από την υπολειπόμενη μετά το χειρουργείο νόσο. Το ποσοστό υποτροπής στη δεκαετία κυμαίνεται μεταξύ 80-85% για τις γυναίκες με μεγάλο όγκο υπολειπόμενης νόσου (bulky disease) μετά το χειρουργείο εν συγκρίσει προς 70% για αυτές που υποβλήθηκαν σε βέλτιστη ογκομείωση (υπολειπόμενη νόσος $\leq 1\text{cm}$). Συνολικά περίπου 20-25% των ασθενών με προχωρημένη νόσο αναμένεται να επιβιώσουν πέραν της πενταετίας μετά την αρχική θεραπεία και η πιθανότητα αυτή αυξάνεται με τη βέλτιστη ογκομείωση (10)



ΕΙΚΟΝΑ 5. Επιβίωση σε σχέση με την διάμετρο της μεγαλύτερης υπολειμματικής νόσου (85).

Όσον αφορά την ηλικία οι νεότερες ασθενείς είναι πιο πιθανό να έχουν καλύτερη πρόγνωση, γιατί σε αυτές εμφανίζονται συχνότερα λιγότερο επιθετικοί όγκοι και καλώς διαφοροποιημένοι. Επίσης οι νεότερες γυναίκες κατά κανόνα έχουν καλύτερη γενική κατάσταση (performance status), ενώ οι ηλικιωμένες έχουν συχνότερα συνυπάρχουσες παθήσεις που επιβαρύνουν την υγεία τους (82, 91). Ενδεχομένως επίσης πολλοί θεράποντες να διστάζουν να αντιμετωπίσουν επιθετικά μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες και αυτό να μεταφράζεται σε πρόοδο της νόσου, αν και δεδομένα υποστηρίζουν πως ηλικιωμένες ασθενείς με καλή γενική κατάσταση ανέχονται εξίσου καλά με τις νεότερες ασθενείς τις εντατικές θεραπείες (91).

Ο διαυγοκυτταρικός ιστολογικός τύπος γενικώς θεωρείται αρνητικός προγνωστικός παράγοντας με πτωχή ανταπόκριση στην τρέχουσα χημειοθεραπεία του επιθηλιακού ωθηκικού καρκίνου. Πρόσφατες μελέτες με μικροσυστοιχίες αποκάλυψαν ότι ο διαυγοκυτταρικός καρκίνος έχει ένα γονιδιακό πρότυπο που διαφέρει από αυτό του ορώδους με αποτέλεσμα ένα μοναδικό, βιολογικό φαινότυπο με μία ενδογενή αντοχή στην χημειοθεραπεία (92). Στον επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών αρχικού σταδίου, μάλιστα, η ανάδειξη διαυγοκυτταρικού ιστολογικού τύπου ισοδυναμεί με χαμηλής διαφοροποίησης (grade 3) καρκίνο (83). Αλλά και ο βλενώδης ιστολογικός τύπος, αν και σπανιότερος, είναι επιθετικός. Είναι πιθανόν ότι κάποιοι βλενώδεις όγκοι είναι στην πραγματικότητα μεταστάσεις στην ωθήκη από το κόλον οπότε η χορηγούμενη χημειοθεραπεία για τον υποτιθέμενο ωθηκικό καρκίνο δεν είναι η ενδεδειγμένη. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει δείκτες που ενδεχομένως να βοηθήσουν στην διαφορική διάγνωση του ωθηκικού από τον πρωτοπαθή καρκίνο του κόλου (93).

Ο βαθμός διαφοροποίησεως είναι ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας στον επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών αρχικού σταδίου, αν και δεν φαίνεται να προδικάζει άσχημη έκβαση σε προχωρημένη νόσο (87, 94). Έτσι σε ασθενείς σταδίου IA ή IB με καλά διαφοροποιημένο (grade 1) καρκίνο η 5-ετής επιβίωση είναι >90% και με βάση τις τρέχουσες απόψεις δεν χρειάζεται να λάβουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Αντίθετα όταν η διαφοροποίηση είναι μέτρια ή χαμηλή (grade 2 ή 3) οι ασθενείς είναι υψηλού κινδύνου για υποτροπή και χρήζουν συμπληρωματικής χημειοθεραπείας.

Εκτός από τους άνω κλινικοπαθολογοανατομικούς προγνωστικούς παράγοντες αρκετοί βιολογικοί και ανοσολογικοί έχουν συσχετισθεί με την πρόγνωση του επιθηλιακού καρκίνου των ωθηκών. Μια πρόσφατη μελέτη μάλιστα υποστηρίζει ευνοϊκότερη πρόγνωση για τις ασθενείς των οποίων οι όγκοι περιέχουν T-λεμφοκύτταρα εν συγκρίσει με τις ασθενείς των οποίων οι όγκοι στερούνται μια τέτοια λεμφοκυτταρική διήθηση (95). Η διαφορά αυτή ήταν πλέον εντυπωσιακή σε γυναίκες με πλήρη κλινική ανταπόκριση (CR, complete response) κατόπιν χειρουργικής ογκομείωσης και συμπληρωματικής χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα (21, 96, 97).

3. ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ (VEGF)

Ο κυρίαρχος παράγων που ελέγχει την αγγειογένεση είναι ο αυξητικός παράγων του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), ο οποίος είναι ένα 35- 45-kD διμερές πολυπεπίδιο. Αποτελεί τμήμα ενός συστηματικού μηχανισμού ο οποίος αποκαθιστά την παροχή οξυγόνου στους ιστούς όταν η αιμάτωση είναι ανεπαρκής. Η φυσιολογική δραστηριότητα του VEGF είναι η δημιουργία νέων αγγείων κατά την διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, μετά από τραυματισμό, μετά από μυϊκή άσκηση , ο σχηματισμός παράπλευρης κυκλοφορίας σε αποφραγμένα αγγεία και η διατήρηση της φυσιολογικής αρτηριακής πίεσης. Η υπερβολική έκφραση του VEGF μπορεί να οδηγήσει σε νόσο. Οι όγκοι δεν μπορούν να αναπτυχθούν πέρα από ένα περιορισμένο μέγεθος χωρίς να έχουν επαρκή αιμάτωση για αυτό το λόγο ο VEGF που παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητος για την περαιτέρω ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου. Η υπερέκφραση του VEGF μπορεί να προκαλέσει αγγειακή νόσο σε αρκετά σημεία του ανθρωπίνου σώματος όπως στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού. Τα φάρμακα τα οποία μπορούν να αναστείλουν τον VEGF όπως το bevacizumab συμβάλλουν στον έλεγχο και την επιβράδυνση αυτών των νόσων. Ο όρος VEGF στην πραγματικότητα αναφέρεται σε μια οικογένεια αυξητικών παραγόντων που περιλαμβάνουν επτά διαφορετικές πρωτεΐνες, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα (PlGF) 1 και 2. Αυτή η ομάδα αυξητικών παραγόντων έχει πολλή σημαντική δράση τόσο στον αρχικό σχηματισμό του εμβρυικού κυκλοφορικού συστήματος όσο και στην ανάπτυξη νέων αγγείων στο υπάρχον κυκλοφορικό σύστημα.

Ταξινόμηση

Το πιο σημαντικό μέλος της ομάδας των αυξητικών παραγόντων που συνιστούν τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου είναι ο VEGF-A. Τα

υπόλοιπα μέλη, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PIGF) 1 και 2, ανακαλύφθηκαν αργότερα και μέχρι την ανακάλυψη τους ο VEGF-A αναφερόταν απλά ως VEGF. Έχει ανακαλυφτεί και ένας αριθμός πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον VEGF οι οποίες είναι κωδικοποιημένες στο γεννητικό υλικό ιών (VEGF-E) καθώς και στο δηλητήριο κάποιων φιδιών (VEGF-F) . Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι κυριότεροι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας του VEGF καθώς και η κύρια δράση τους.

ΕΙΔΟΣ	ΔΡΑΣΗ
VEGF-A	<ul style="list-style-type: none"> • Αγγειογένεση <ul style="list-style-type: none"> ↑ Μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων ↑ Μίτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων ↑ Δραστηριότητας της μονοοξυγενάσης του μεθανίου ↑ Δραστηριότητας του αβν3 Δημιουργία του εσωτερικού αυλού των αγγείων Δημιουργία θυριδωτού ενδοθηλίου • Χημειοταξία για μακροφάγα και κοκκιοκύτταρα • Αγγειοδιαστολή (έμμεσα μέσω της απελευθέρωσης NO)
VEGF-B	Εμβρυική αγγειογένεση
VEGF-C	Λεμφαγγειογένεση
VEGF-D	Απαραίτητος για την ανάπτυξη του λεμφαγγειακού δικτύου που περιβάλλει τα βρογχιόλια του πνεύμονα
PIGF	Σημαντικός στην εμβρυϊκή αγγειογένεση. Επίσης συμμετέχει στην αγγειογένεση που σχετίζεται με ισχαιμία, φλεγμονή, επούλωση τραύματος και καρκίνο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.

Η δράση του VEGF-A έχει μελετηθεί κυρίως σε κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου, όπως υποδηλώνει και το όνομα του μολονότι έχει επίδραση και σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως κύτταρα του νευρικού συστήματος, καρκινικά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού ενώ παρακινεί και την μετανάστευση των μονοκυττάρων, μακροφάγων.

Μια διαφορετική ταξινόμηση των διαφόρων πρωτεϊνών που συνιστούν τον όρο του VEGF τις χωρίζει σε δυο οικογένειες που προκύπτουν από την διαφορετική αποκοπή και συρραφή του VEGF mRNA το οποίο μεταγράφεται από ένα μοναδικό γονίδιο 8 εξονίων του VEGF. Συγκεκριμένα οι δυο οικογένειες διαφέρουν στην αποκοπή και συρραφή του όγδοου εξονίου του VEGF και ταξινομούνται ανάλογα με το εάν το μάτισμα έγινε σε εγγύς η περιφερική θέση. Επιπροσθέτως αλλαγές στο μάτισμα των εξονίων 6 και 7 μεταβάλλει την συνάφεια σύνδεσης με την ηπαρίνη και καθώς και τον αριθμό των αμινοξέων. Αυτά τα τμήματα έχουν σημαντικές λειτουργικές συνέπειες στην διαμόρφωση του μορίου του VEGF αλλά το μάτισμα του τελικού εξονίου, (εξόνιο 8), καθορίζει εάν οι πρωτεΐνες θα είναι προ-αγγειογεννητικές ή αντι-αγγειογεννητικές. Επιπλέον η περίληψη ή ο αποκλεισμός των εξονίων 6 και 7 ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θειϊκών ηπαρινισμένων πρωτεογλυκανών (HSPGs) και των συνυποδοχέων νευροπιλίνης στην κυτταρική επιφάνεια ενισχύοντας την ικανότητα του μορίου του VEGF να συνδέεται και να ενεργοποιεί τους υποδοχείς του (VEGFRs) (98).

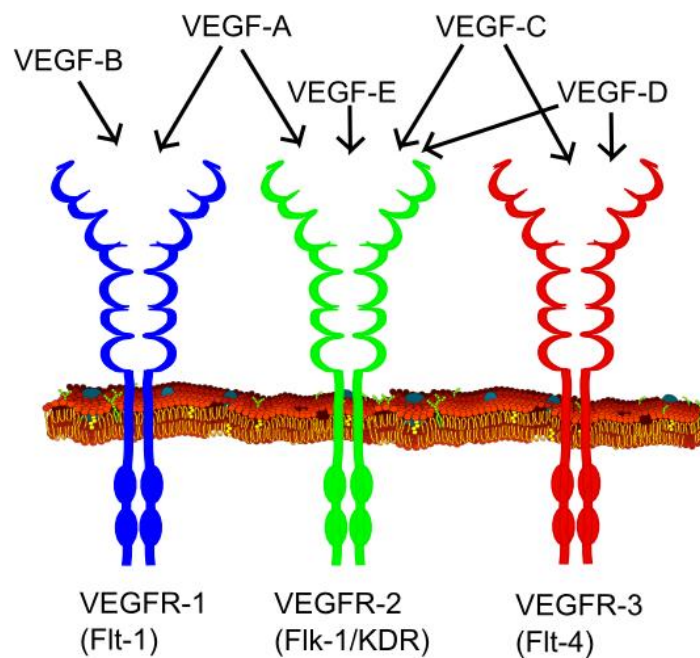
Υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα

Όλα τα μέλη της οικογένειας του VEGF διεγείρουν τις κυτταρικές αντιδράσεις μέσω της σύζευξης με ειδικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (VEGFRs) στην κυτταρική επιφάνεια. Το μόριο του VEGF τους διμεροποιεί και οδηγεί σε ενδοκυτταρική μετάδοση του σήματος μέσω τρανσφοροριλίωσης. Ο VEGF συνδέεται με 3 πρωταρχικούς υποδοχείς και 2 συνυποδοχείς. Οι δυο από τους πρωταρχικούς υποδοχείς ο VEGFR-1 και ο VEGFR-2 σχετίζονται με την

αγγειογένεση. Ο τρίτος πρωταρχικός υποδοχέας, ο VEGFR-3, σχετίζεται με την λεμφαγγειογένεση. Οι υποδοχείς του VEGF αποτελούνται από ένα εξωκυτταρικό τμήμα επτά ανοσοσφαιρινών, ένα ενδομεμβρανικό τμήμα που παίζει κυρίως το ρόλο γέφυρας μεταξύ του εξωκυτταρικού και του ενδοκυτταρικού τμήματος που περιέχει ένα τμήμα τυροσινικής κινάσης. Ο VEGF-A συνδέεται στον VEGFR-1(Flt-1) και στον VEGFR-2(KDR/Flt-1). Ο VEGFR-2 φαίνεται να μεσολαβεί σε όλες τις γνωστές κυτταρικές απαντήσεις στον VEGF (99). Η λειτουργικότητα του VEGFR-1 δεν είναι τόσο καλά καθορισμένη αν και πιστεύεται ότι ρυθμίζει την σηματοδότηση του VEGFR-2. Μια άλλη λειτουργία του VEGFR-1 είναι ίσως να δρα απλά σαν ένα μέσο παραπλάνησης απομονώνοντας τον VEGF και μη επιτρέποντας του να συνδεθεί στον VEGFR-2. Κάτι τέτοιο φαίνεται να είναι πολύ σημαντικό κατά την αγγειογένεση που λαμβάνει χώρα στο έμβρυο. Οι VEGF-C και VEGF-D αλλά όχι ο VEGF-A συνδέονται με τον τρίτο υποδοχέα VEGFR-3 που ρυθμίζει την λεμφαγγειογένεση. Πρόσφατα, δείχθηκε πως ο VEGF-C είναι ένας σημαντικός επαγωγέας της νευρογένεσης σε πειράματα σε ποντικό, χωρίς να ασκήσει αγγειογενετικές δράσεις (100). Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι πρωταρχικοί υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, η κύρια δράση στην οποία μεσολαβούν καθώς και οι συνδέσεις τους.

Υποδοχείς	Δράση	Συνδέσεις
VEGFR-1	Συμβάλλει στην εμβρυική αγγειογένεση	VEGF-A VEGF-B PlGF
VEGFR-2	Μεσολαβεί στις περισσότερες αγγειογενετικές δράσεις του VEGF	VEGF-A VEGF-C VEGF-D VEGF-E
VEGFR-3	Προωθεί την λεμφαγγειογένεση	VEGF-C VEGF-D

ΠΙΝΑΚΑΣ 8.



ΕΙΚΟΝΑ 6. Τύποι του VEGF και οι υποδοχείς τους (101).

Παραγωγή και φυσιολογική δράση του VEGF

Στην φυσιολογική κατάσταση ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου μπορεί να παραχθεί από κύτταρα που δεν λαμβάνουν αρκετό οξυγόνο (99). Όταν ένα κύτταρο εμφανίζει ανεπάρκεια σε οξυγόνο παράγει τον HIF (hypoxia-inducible factor). Ο HIF διεγείρει την απελευθέρωση του VEGF ανάμεσα στις άλλες δράσεις του όπως η ρύθμιση της ερυθροποίησης. Ο HIF1 άλφα και ο HIF1 βήτα παράγονται συνεχώς από τα κύτταρα ωστόσο ο HIF1 άλφα είναι ιδιαίτερα ασταθής σε περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, έτσι σε αερόβιες συνθήκες είναι μειωμένος. Ωστόσο όταν το κύτταρο γίνει υποξικό ο HIF1 άλφα διατηρείται και το σύμπλεγμα του HIF1 άλφα με τον βήτα διεγείρει την παραγωγή του VEGF. Ο VEGF που απελευθερώνεται στην περιφερική κυκλοφορία, στη συνέχεια συνδέεται στους υποδοχείς του στα ενδοθηλιακά κύτταρα δίνοντας το έναυσμα για ένα ενδοκυτταρικό μοριακό μονοπάτι ενεργοποίησης της τυροσινικής κινάσης που οδηγεί στην αγγειογένεση. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι άμεσες δράσεις του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου περιλαμβάνουν τα εξής:

- i) υποκινεί την μιτογένεση του ενδοθηλίου,
- ii) προωθεί την επιβίωση του ενδοθηλίου μέσω ενός Akt-εξαρτώμενου μονοπατιού,
- iii) ελέγχει την αγγειακή διαπερατότητα. Ο VEGF είναι 50.000 φορές πιο ισχυρός στο να αυξάνει την αγγειακή ροή από την ισταμίνη,
- iv) υποκινεί την έκφραση του ενεργοποιητή πλασμινογόνου του ιστού, του ενεργοποιητή πλασμινογόνου της ουροκινάσης, κολλαγενασών και μεταλλοπρωτεϊνών της μεσοκυττάριας ουσίας. Όλα αυτά εμπλέκονται στην μείωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (extracellular matrix, ECM), που είναι απαραίτητη για την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- v) Ο VEGF, επίσης δρα και σαν φυσιολογικός ρυθμιστής της ερυθροποίησης των ενηλίκων και της σύνθεσης ερυθροποιητίνης, καθώς η αναστολή του αυξάνει την φυσιολογικά αδρανή έκφραση της ερυθροποιητίνης μέσω ενός εξαρτώμενου από τον VEGF διασταυρούμενου μονοπατιού ενδοθηλίου- ηπατοκυττάρων.

- vi) Επιπροσθέτως, ο VEGF, σε παθοφυσιολογικές συγκεντρώσεις, εμπλέκεται και στην ανάπτυξη των T-κυττάρων στον Θύμο αδένα από τους αιμοποιητικούς τους προγεννήτορες.

Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου λόγω της πολύπλευρης δράσης του έχει συσχετιστεί κλινικά με την πρόοδο και την εξέλιξη πολλών νόσων. Αρκετές μελέτες έδειξαν μειωμένη συνολική επιβίωση και διάστημα επιβίωσης χωρίς την παρουσία της νόσου των ασθενών με καρκίνο μαστού που έχουν όγκους που υπερεκφράζουν τον VEGF. Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου επίσης έχει σημαντικό ρόλο στην ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ο VEGF απελευθερώνεται ως απάντηση στον TNF- α , αυξάνοντας την διαπερατότητα του αγγειακού ενδοθηλίου, το οίδημα καθώς επίσης διεγείρει το σχηματισμό νέων τριχοειδών αγγείων. Μια ακόμη νόσος όπου συμμετέχει ο VEGF είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Η εκφύλιση των τριχοειδών αγγείων του αμφιβληστροειδούς των διαβητικών προκαλεί ισχαιμία του οργάνου και αυτή με τη σειρά της απελευθέρωση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου καθώς και το σχηματισμό νέων αγγείων τόσο στον αμφιβληστροειδή όσο και σε άλλα σημεία του οφθαλμού επιφέροντας αλλαγές που απειλούν την όραση. Ο VEGF διαδραματίζει επίσης ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία και αποτελεί την πρώτη αιτία τύφλωσης των ηλικιωμένων στον αναπτυγμένο κόσμο. Αυξημένα επίπεδα του υπότυπου VEGF-D έχουν ανακαλυφθεί σε ασθενείς που πάσχουν από αγγειοσάρκωμα (102). Επίσης, σε ασθενείς που πάσχουν από πνευμονικό εμφύσημα έχει βρεθεί πως έχουν μειωμένα επίπεδα του VEGF στις πνευμονικές αρτηρίες. Στο νεφρό επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα του VEGF στον νεφρώνα συνδέονται με νεφρική υπερτροφία και πρωτεϊνουρία (103). Τέλος, αλλαγές στα επίπεδα του VEGF μπορεί να είναι προγνωστικά πρόωρης έναρξης προεκλαμψίας (104).

4. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ

Η αγγειογένεση διαδραματίζει ένα ζωτικής σημασίας ρόλο στην αύξηση και ανάπτυξη ενός όγκου καθώς παρέχει στα καρκινικά κύτταρα όλα τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο που είναι απαραίτητα για την επιβίωση τους. Χωρίς την αγγειογένεση, οι εμφυτεύσεις του όγκου αδυνατούν να αναπτυχθούν πάνω από 1mm σε μέγεθος (105). Αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από μια ισορροπία προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων και η επιστημονική έρευνα κατά την διάρκεια των τριών τελευταίων δεκαετιών έχει αναγνωρίσει αρκετά μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στην νεοαγγειογένεση του όγκου. Η έναρξη της αγγειογένεσης λαμβάνει χώρα όταν οι προ-αγγειογενετικοί παράγοντες επικρατούν επί των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (αγγειογενετικός διακόπτης) ούτως να προωθήσουν το σχηματισμό νέων αγγείων και να επιτρέψουν την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. Η έκφραση αυτών των προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως είναι και ο αυξητικός παράγων του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), έχειδειχθεί πως αυξάνεται σε γυναικολογικές κακοήθειες και έχει συσχετιστεί με μικρότερο διάστημα επιβίωσης χωρίς την παρουσία νόσου καθώς και μικρότερα ποσοστά συνολικής επιβίωσης. Η κατανόηση των μοριακών μονοπατιών που εμπλέκονται στην διαδικασία της αγγειογένεσης και η ανακάλυψη των δυνητικών αγγειογενετικών στόχων οδήγησε στην ανάπτυξη νέων παραγόντων με αντι-αγγειογενετική δράση. Αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν επιδείξει δραστικότητα έναντι του όγκου τόσο σε προκλινικές μελέτες όσο και σε κλινικές δοκιμές.

Αγγειογένεση του όγκου

Η αγγειογένεση του όγκου είναι μια περίπλοκη διαδικασία και περιλαμβάνει πολλά μονοπάτια. Ως απάντηση σε ερεθίσματα όπως η υποξία, το οξειδωτικό στρες και η οξείδωση, αρκετοί προαγγειογενετικοί παράγοντες που περιλαμβάνουν τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (FGF) και τον αυξητικό παράγοντα εκ των αιμοπεταλίων (PDGF)

απελευθερώνονται από το ενδοθήλιο, το στρώμα και τα κύτταρα του όγκου στο μικροπεριβάλλον (106). Η απελευθέρωση αυτών των παραγόντων οδηγεί στη στρατολόγηση των προγεννητικών κυττάρων του ενδοθηλίου (EPCs) από το μυελό των οστών για να σχηματίσουν νέα αγγεία. Φυσιολογικά η διαδικασία αυτή μπορεί να εμποδιστεί από την δράση παραγόντων που περιλαμβάνουν την θρομβοσπονδίνη-1, την ενδοστατίνη και την αγγειοστατίνη (107). Νεοαγγειογένεση στους όγκους μπορεί επίσης να συμβεί από την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον αυλό προϋπαρχόντων αγγείων διαμέσου της βασικής μεμβράνης στον υποκείμενο εξωκυττάριο χώρο (ECM), αναπτύσσοντας μια επιμήκη μορφολογία (αγγειογένεση εκ βλάστησης). Η μη αγγειογένεση εκ βλάστησης περιλαμβάνει τον «αγγειογενών μιμιτισμό» (ανάπτυξη μικροαγγειακών αυλών από επιθετικά καρκινικά κύτταρα) και την «αγγειακή συν-επιλογή» (καρκινικά κύτταρα αρχικά προσκολλώνται στο προϋπάρχον αγγειακό σύστημα.

Η ικανότητα των αυξητικών παραγόντων όπως οι FGF, VEGF, το σύστημα αυξητικών παραγόντων που ομοιάζουν με την ινσουλίνη (IGF) και ο υποκινούμενος από την υποξία παράγων-1 άλφα (HIF-1α) να αυξάνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει δείχθει σε αρκετά πειραματικά μοντέλα σε ζώα. Ο πολλαπλασιασμός είναι σε μεγάλο βαθμό περιορισμένος στις ισχαιμικές περιοχές ακόμη και μετά από συστηματική χορήγηση αυτών των παραγόντων (108). Ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου δεν είναι διασαφηνισμένος αλλά ίσως να εμπλέκεται η περιορισμένη τοπικά έκφραση των υψηλής συνάφειας υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, η τοπική αλληλεπίδραση των αυξητικών παραγόντων και των αναστολέων της αγγειογένεσης που προέρχονται από την εξωκυττάρια ουσία καθώς και η παρουσία ή απουσία άλλων ρυθμιστικών μορίων (109). Ειδικές αγγειοποιητίνες φαίνεται να ρυθμίζουν την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και την αλληλεπίδραση τους με τα υποστηρικτικά περικύτταρα.(110). Επιπροσθέτως, η ικανότητα των ιστών να απαντούν στην αγγειογενετική σηματοδότηση ίσως να υπόκειται σε ρύθμιση από αλλαγές στη σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, που περιλαμβάνει την έκφραση των ενζύμων πέψης της εξωκυττάριας ουσίας όπως των μεταλλοπρωτεϊνολυτικών και των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνολυτικών του ιστού (TIMPs) (111). Οι αλλαγές στην έκφραση των ακεραίων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας στα ενδοθηλιακά κύτταρα (eg, avb3

και ανβ5 ιντεγκρίνες) και των πρωτεϊνογλυκανών που φέρουν ηπαρινισμένα σουλφίδια (όπως οι συνδεκάνες) ίσως να είναι σημαντικές επίσης.

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, η αγγειογένεση ελέγχεται τόσο από θετικές όσο και αρνητικές επιρροές. Η ύπαρξη αυτών των δυο κατηγοριών των ρυθμιστικών μορίων έχει οδηγήσει σε δυο χωριστές στρατηγικές για να εμποδιστεί η παθολογική αγγειογένεση. Η πρώτη αφορά την αναστολή των παραγόντων που δρουν θετικά όπως ανταγωνιστές του υποδοχέα του VEGF αντισώματα έναντι του VEGF, του υποδοχέα του ή των επιφανειακών πρωτεϊνών των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η δεύτερη αφορά την εξωγενή χορήγηση παραγόντων που προκαλούν μια ενδογενή αρνητική ρύθμιση της αγγειογένεσης όπως είναι η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη, φουμαγιλίνη (TNP-470) και οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας.

Ο ρόλος του VEGF

Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου με αρκετούς σημαντικούς τρόπους (112, 113, 114). i) Ενισχύει την επιβίωση των υπαρχόντων αγγείων. ii) Συμβάλλει σε αγγειακές ανωμαλίες (π.χ. υψηλή διάμεση πίεση) οι οποίες μπορεί να εμποδίζουν αποτελεσματικά την χορήγηση των χημειοθεραπευτικών ουσιών. iii) Διεγείρει την ανάπτυξη νέων αγγείων και iv) Ίσως εμποδίζει την ανοσολογική απάντηση στους όγκους. Η σύνδεση του VEGF στους υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων σηματοδοτεί την έναρξη της δημιουργίας ενός αγγειακού δικτύου που προσφέρει στους όγκους πρόσβαση σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά που τους είναι απαραίτητα για να αναπτυχθούν και να δώσουν μεταστάσεις (114). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα χρειάζονται τον VEGF για να συνεχίσουν να επιβιώνουν σε ανώριμα αιμοφόρα αγγεία. Σε απουσία αυξητικών σημάτων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Μετά την σύνδεση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων με τα περικύτταρα (αγγειακή ωρίμανση), ο VEGF δεν είναι πλέον απαραίτητος για επιβίωση (115).

Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου διεγείρει την αγγειακή διαπερατότητα στα μικρά αιμοφόρα αγγεία. Η αυξημένη διαπερατότητα προκαλεί τη διαρροή των πρωτεϊνών του πλάσματος και τον σχηματισμό μιας εξωαγγειακής γέλης ινώδους, παρέχοντας ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στους όγκους τα υψηλά επίπεδα του VEGF επιφέρουν ένα αγγειακό δίκτυο το οποίο είναι υπερβολικά διαπερατό και διαρρέων, που οδηγεί σε αυξημένη διάμεση πίεση εντός του όγκου και άνιση παροχή θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου και θεραπευτικών παραγόντων στον όγκο (116). Οι όγκοι δεν αποτελούνται εξ ολοκλήρου από κακοήγη κύτταρα. Στην πραγματικότητα, λιγότερο από το μισό του μεγέθους του όγκου ίσως είναι καρκινικά κύτταρα. Το 1-10% του όγκου είναι αιμοφόρα αγγεία και το υπόλοιπο είναι διάμεσος ιστός, μια ουσία πλούσια σε κολλαγόνο η οποία περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα και τα διαχωρίζει από το αγγειακό δίκτυο (117, 118). Το αγγειακό δίκτυο που σχηματίστηκε από την επίδραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) είναι διαπερατό εξαιτίας των χασμάτων ανάμεσα των ενδοθηλιακών κυττάρων και ανοιγμάτων εντός των ίδιων των κυττάρων. Εξαιτίας της υπερβολικής διαπερατότητας του αγγειακού δικτύου που σχηματίστηκε από την επίδραση του VEGF, το υγρό μπορεί να διαρρεύσει από τα αγγεία του όγκου στον διάμεσο χώρο (116, 117). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια αξιοσημείωτα υψηλή διάμεση πίεση σε όλη την έκταση του εσωτερικού του όγκου, ενώ η πίεση στις εξόχως απόκεντρες περιοχές παραμένει κοντά σε στα φυσιολογικά επίπεδα (117). Αντιθέτως η πίεση στις φλέβες τα επικρατέστερα αγγεία στους όγκους, είναι μειωμένη σε σχέση με τις φλέβες στο φυσιολογικό ιστό. Επομένως υπάρχει ένα διπλό αποτέλεσμα αυξημένης διάμεσης πίεσης στο εσωτερικό των όγκων και μειωμένης πίεσης στα αγγεία των όγκων (118). Μιας και τα μόρια υψηλού μοριακού βάρους, στα οποία περιλαμβάνονται και οι θεραπευτικοί παράγοντες μεταφέρονται στην πλειονότητα τους με διάχυση (από περιοχές υψηλής πίεσης σε περιοχές χαμηλής πίεσης), η υψηλή διάμεση πίεση των όγκων μπορεί να εμποδίσει την παροχή των θεραπευτικών παραγόντων από την κυκλοφορία του αίματος στα καρκινικά κύτταρα του όγκου (117, 118).

Οι όγκοι έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς για να αποφύγουν την ανοσολογική απάντηση. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς περιλαμβάνει την καταστολή των δενδριτικών κυττάρων τα οποία είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα τα οποία διεγείρουν τα Β και τα Τ κύτταρα. Πρόσφατα έχει δειχθεί στο

εργαστήριο ότι ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) μπορεί να εμποδίσει την λειτουργική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων από τους αιμοποιητικούς τους προγεννήτορες. Για αυτό το λόγο η έκκριση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου από τα κακοήθη κύτταρα του όγκου ίσως διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην καταστολή της ανοσολογικής απάντησης έναντι του όγκου (119).

Ο VEGF σαν θεραπευτικός στόχος στα κακοήθη νεοπλάσματα

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές θεραπείες έναντι του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου που χρησιμοποιούνται στην θεραπευτική προσέγγιση ποικίλων νόσων αλλά κυρίως στην αντιμετώπιση αρκετών μορφών καρκίνου. Οι παράγοντες που στοχεύουν τη δράση του VEGF αρχικά αναπτύχθηκαν σύμφωνα με την αντίληψη ότι θα αναστείλουν την ανάπτυξη νέων αγγείων στο περιβάλλον της κακοήθειας και για αυτό το λόγο θα περιορίσουν την πρόσληψη από τον όγκο των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου και θα οδηγήσουν στη συσσώρευση τοξικών αποβλήτων. Στις μέρες μας, ωστόσο γίνεται όλο και περισσότερο εμφανές ότι το όφελος από τη θεραπεία έναντι του VEGF είναι περίπλοκο και πιθανώς περιλαμβάνει πολλαπλούς μηχανισμούς (120).

Οι φαρμακευτικοί αυτοί παράγοντες, περιλαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τον VEGF ή τους υποδοχείς του, μόρια που μιμούνται τους υποδοχείς του VEGF καθώς και διαθέσιμα και για χορήγηση και από το στόματος οργανικά μόρια που αναστέλλουν την τυροσινική κινάση που ενεργοποιείται από τον VEGF. Κάποιοι απ' αυτούς βρίσκονται ακόμη στη φάση κλινικών δοκιμών ενώ άλλοι έχουν ήδη πάρει την έγκριση των εθνικών οργανισμών φαρμάκων και χρησιμοποιούνται στη κλινική πράξη είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τη συμβατική θεραπεία.

Ο εθνικός οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) έχει εγκρίνει την χρήση στη κλινική πράξη αρκετών φαρμάκων με αντιαγγειογενετική δράση που έχουν δείξει υποσχόμενη δράση έναντι των όγκων σε διάφορες μορφές καρκίνου (121). Ο πρώτος παράγοντας που αναστέλλει την αγγειογένεση, ο οποίος έλαβε την έγκριση για χρήση στην κλινική πράξη είναι το bevacizumab (Avastin; Roche), ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που εξουδετερώνει τον VEGF και την αγγειογενετική του δράση. Το bevacizumab έλαβε την έγκριση προς χρήση σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία στη αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου το 2004 (122). Ακολούθως ενεκρίθη η χορήγηση του σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (123), με γλοιοβλάστωμα (124) και με καρκίνο του νεφρού (125). Η χρήση του, επίσης ενεκρίθη και στην αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του μαστού, σε συνδυασμό με το συμβατικό χημειοθεραπευτικό παράγοντα πακλιταξέλη (126). Άλλοι παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν την αγγειογένεση και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη είναι το sorafenib και το sunitinib που είναι αναστολείς μικρών μορίων καθώς εμποδίζουν την ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης τόσο των υποδοχέων του VEGF όσο και άλλων αυξητικών παραγόντων όπως του αυξητικού παράγοντα προερχόμενου από τα αιμοπετάλια (PDGF) (127). Ο εθνικός οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ενέκρινε την χρήση του sorafenib στην αντιμετώπιση του καρκίνου του νεφρού το 2005 (128) και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος το 2007 (129). Ενώ το 2007 το sunitinib έγινε το πρώτο αντιαγγειογενετικό φάρμακο που εγκρίθηκε η χρήση του για δύο είδη καρκίνου την ίδια χρονική στιγμή, τον καρκίνο του νεφρού και του γαστρεντερικού στρωματικού όγκου (130). Στις μέρες μας, πλήθος ακόμη αντιαγγειογενετικών παραγόντων βρίσκονται στα τελικά στάδια των κλινικών δοκιμών.

Στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών έχει δοκιμαστεί και βρίσκεται υπό δοκιμή σημαντικός αριθμός αντιαγγειογενετικών παραγόντων. Ο παράγων που βρίσκεται στην πιο εξελιγμένη φάση ανάπτυξης είναι το αντι-VEGF μονοκλωνικό αντίσωμα bevacizumab. Η προσθήκη του bevacizumab στην 1^{ης} γραμμής χημειοθεραπεία ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών φαίνεται να αυξάνει σημαντικά το ελεύθερο διάστημα χωρίς εξέλιξη της νόσου (131). Το όφελος αυτό φάνηκε να είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις ασθενείς υψηλού κινδύνου με προχωρημένη νόσο (στάδιο III με υπολειπόμενη νόσο >1cm η στάδιο IV), στους

οποίους παρατηρήθηκε και όφελος στην συνολική επιβίωση (132). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν πολλές Ευρωπαϊκές χώρες να εγκρίνουν τη χρήση του bevacizumab ως πρώτης γραμμής θεραπεία για τις ασθενείς με στάδια IIIB, III C και IV με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, καρκίνο της σάλπιγγας ή πρωτοπαθές καρκίνο περιτοναίου (133).

Η δραστηριότητα του bevacizumab στον καρκίνο των ωοθηκών υπογραμμίζεται και από το γεγονός ότι τυχαιοποιημένες μελέτες ανέδειξαν όφελος από την προσθήκη του και σε υποτροπιάζουσα νόσο, είτε ευαίσθητη στην πλατίνη (134) είτε σε πλατινοανθεκτική νόσο (135). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αποτελούν την απόδειξη ότι η αγγειογένεση αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο στον προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αγγειογένεση είναι μια βασική διαδικασία, η οποία απαιτείται σε αρκετές παθοφυσιολογικές διεργασίες, όπως είναι και η ανάπτυξη του καρκίνου. Η εξέλιξη της αγγειογένεσης ρυθμίζεται από έναν αριθμό προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών μορίων. Ως απάντηση σε διεργετικούς παράγοντες όπως η υποξία, το οξειδωτικό στρες και την οξείδωση αρκετοί προαγγειογενετικοί παράγοντες από κύτταρα του ενδοθηλίου, της βασικής στοιβάδας και του όγκου απελευθερώνονται στο μικροπεριβάλλον (106). Πάνω από 30 αγγειογενετικοί παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί και αναφερθεί πως έχουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση με κυρίαρχο αυξητικό παράγοντα που ελέγχει αυτή την διαδικασία τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) (136). Ο οποίος είναι ένα διμερές πολυπεπτιδίο με μοριακό βάρος εύρους 35- έως 45-kD. Ο όρος VEGF στην πραγματικότητα, αναφέρεται σε μια οικογένεια αυξητικών παραγόντων που περιλαμβάνουν επτά διαφορετικές πρωτεΐνες, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα (PlGF) 1 και 2 (137). Οι άμεσες δράσεις του περιλαμβάνουν την διέγερση της μιτογένεσης του ενδοθηλίου, την προώθηση της επιβίωσης του ενδοθηλίου, τον έλεγχο της αγγειακής διαπερατότητας και την προώθηση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (138, 139). Επιπλέον, πρόσφατα προτάθηκε ότι ο VEGF ίσως έχει άμεση δράση και στην ανάπτυξη του όγκου (139).

Τα μόρια του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου για να ασκήσουν την αγγειογενετική τους δράση συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς τους, (VEGFR), τους διμεροποιούν και οδηγούν σε ενδοκυτταρική μετάδοση του σήματος. Το μόριο του VEGF μπορεί να συνδεθεί με 3 πρωταρχικούς υποδοχείς, τους VEGFR-1 και VEGFR-2 που σχετίζονται με την αγγειογένεση και τον VEGFR-3 που σχετίζεται με την λεμφοαγγειογένεση (113, 137, 138, 139, 140). Ο δεύτερος υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGFR-2, Flk-1/KDR) είναι υπεύθυνος για την πλειονότητα των αγγειογενετικών αποτελεσμάτων του VEGF, που περιλαμβάνουν την μικροαγγειακή διαπερατότητα, τον πολλαπλασιασμό, την διείσδυση, μετανάστευση και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (112). Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν πως ο VEGF συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου όχι μόνο με το να προωθεί την αγγειογένεση αλλά επίσης μ'

έναν έμμεσο μηχανισμό ρύθμισης των T κυττάρων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απάντηση απέναντι στον όγκο (112, 114, 141, 142). Οι όγκοι, επίσης, έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς για να αποφύγουν την ανοσολογική απάντηση. Αυτοί περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα τα οποία ενεργοποιούν τα B και T κύτταρα καθώς και την έκκριση ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών, όπως την IL-10 και τον TGF- β από τα καρκινικά κύτταρα. Έχει πρόσφατα αποδειχθεί στο εργαστήριο ότι ο VEGF μπορεί να παρακωλύσει την λειτουργική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων από τους αιμοποιητικούς τους προγεννήτορες (119). Επιπροσθέτως, ο VEGF, σε παθοφυσιολογικές συγκεντρώσεις, εμπλέκεται και στην ανάπτυξη των T-κυττάρων στον Θύμο αδένα από τους αιμοποιητικούς τους προγεννήτορες (143). Συνεπώς, εκτός από την αγγειογεννητική του δράση, ο VEGF ίσως να επηρεάζει την πρόοδο του καρκίνου μέσω έμμεσης ρύθμισης των T-κυττάρων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απάντηση απέναντι στον όγκο. Τα T-κύτταρα είναι ο κύριος παράγων στην έναρξη και πρόοδο της ανοσολογικής απάντησης απέναντι στον όγκο σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων και των καρκινωμάτων της ωοθήκης και οι καρκινοπαθείς ασθενείς εμφανίζουν εξασθενημένη ανοσολογική λειτουργία. Ωστόσο, η πιθανή άμεση επίδραση του VEGF στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων καθώς και ο τρόπος που αυτή συμβαίνει δεν έχει ποτέ διευθετηθεί.

Σε προηγούμενες μελέτες της Αιματολογικής-Ογκολογικής Μονάδος της Θεραπευτικής Κλινικής έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα του VEGF στο ασκитικό υγρό ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών σχετίζονται με την πρόγνωση και έχουν αντίστροφη συσχέτιση με πολύ σημαντικούς ανοσολογικά, υποπληθυσμούς των T-κυττάρων, όπως τα CD3⁺CD56⁺ NK-like T κύτταρα (144). Τα επίπεδα του VEGF ήταν ένας ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας σε μια μελέτη τύπου cohort, 65 ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών σταδίων III και IV και η αντίστροφη συσχέτιση με ορισμένους κυτταροτοξικούς υποπληθυσμούς είναι ενδεικτική της ανοσοκατασταλτικής λειτουργίας αυτού του παράγοντα. Ωστόσο, η απευθείας δράση του VEGF στα T-κύτταρα καθώς και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται, δεν έχουν μελετηθεί ακόμη.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο βασικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η πιθανή απευθείας επίδραση του VEGF σε T κύτταρα περιφερικού αίματος και ασκίτη από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών και υγιείς δότριες.

Δευτερεύοντα στοιχεία, τα οποία μελετήθηκαν ήταν: α) η έκφραση των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου στα T κύτταρα β) η επίδραση του VEGF στην κυτταροτοξική δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων αίματος και ασκίτικου υγρού έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών γ) η επίδραση του VEGF στην κυτταροτοξική δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων ασκίτικου υγρού έναντι αυτόλογων καρκινικών κύτταρων.

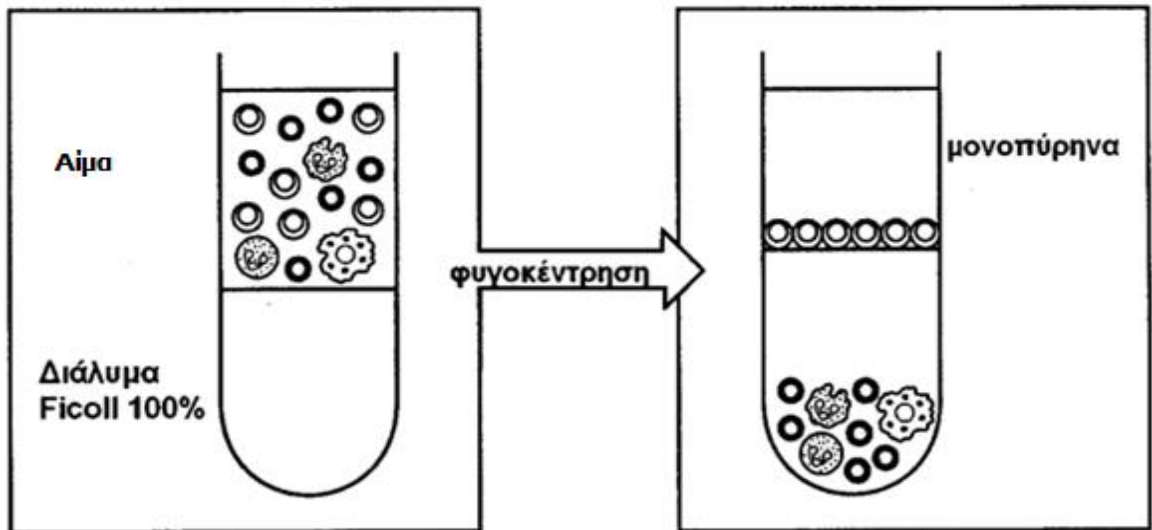
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος και ασκίτικου υγρού από ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών καθώς και δείγματα αίματος από υγιείς δότριες σε ηπαρινισμένα σωληνάρια. Όλες οι ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών που περιλήφθησαν στην μελέτη αντιμετωπίστηκαν στην Α Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική και την Αιματολογική-Ογκολογική μονάδα της Θεραπευτικής Κλινικής του ΕΚΠΑ (ΠΓΝΑ Αλεξάνδρα). Η συλλογή των δειγμάτων αίματος (3ml) έγινε στο εργαστήριο της Ογκολογικής Μονάδας της Θεραπευτικής Κλινικής του ΕΚΠΑ. Η συλλογή του ασκίτικου υγρού (>20ml) έγινε υπό άσηπτες συνθήκες είτε με κοιλιακή παρακέντηση στην Αιματολογική-Ογκολογική μονάδα της Θεραπευτικής Κλινικής του ΕΚΠΑ (ΠΓΝΑ Αλεξάνδρα) είτε κατά την διάρκεια της χειρουργικής αντιμετώπισης των ασθενών στην Α Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική (ΠΓΝΑ Αλεξάνδρα). Το ερευνητικό πρωτόκολλο είχε την έγκριση της επιστημονικής επιτροπής του νοσοκομείου και όλες οι συμμετέχουσες δώσανε την γραπτή συγκατάθεση τους για την συλλογή των δειγμάτων. Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών που έπασχαν αποκλειστικά από επιθηλιακό καρκίνο ωοθήκης ενώ άλλες κακοήθειες ωοθηκών ή καλοήθειες όγκοι δεν περιελήφθησαν. Σε κάθε περιστατικό υπήρξε παθολογοανατομική επιβεβαίωση της διάγνωσης. Στην μελέτη συμπεριλήφθησαν 15

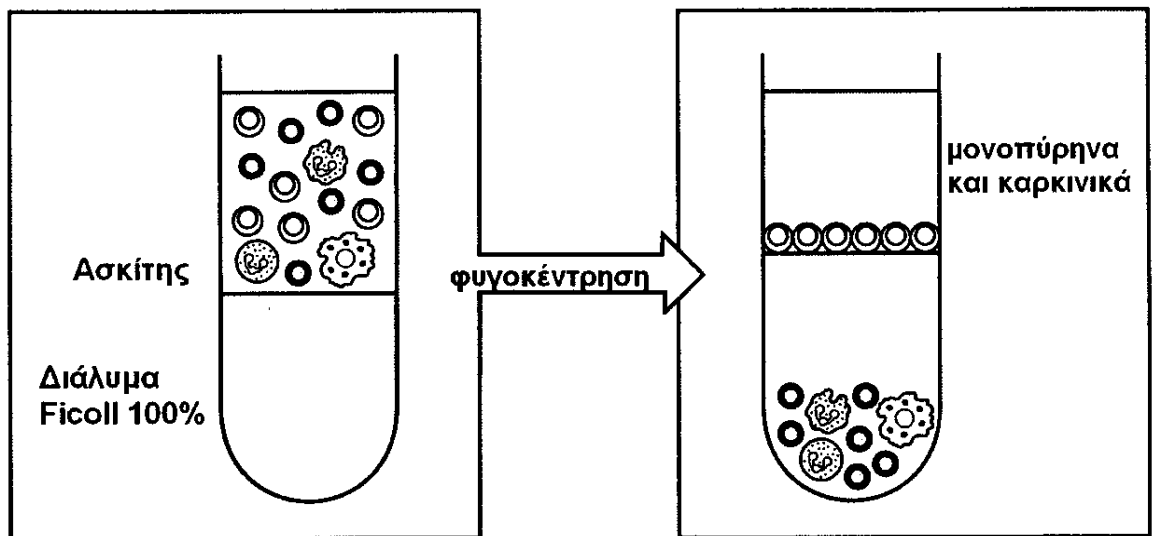
ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών και 10 υγιείς γυναίκες δότριες. Καμία ασθενής δεν είχε λάβει χημειοθεραπεία πριν από την συλλογή του βιολογικού υλικού.

Συλλογή των κυττάρων και καλλιέργειες

Συλλέχτηκαν δείγματα περιφερικού αίματος (περίπου 3ml) υγιών δοτριών καθώς και δείγματα ασκίτικου υγρού (>20ml) και αίματος ασθενών με καρκίνο ωοθηκών σε ηπαρινισμένα σωληνάρια. Αρχικά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων ασκίτικου υγρού στους 1750 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συλλέχτηκε το ίζημα που αποτελούταν από καρκινικά και μονοπύρηννα κύτταρα. Συνοπτικά τόσο κατά την επεξεργασία των δειγμάτων αίματος όσο και ασκίτη, τα μονοπύρηννα κύτταρα διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας κλίση φυγοκέντρησης σε διάλυμα διαχωρισμού Ficoll-Histopaque. (Sigma Chemical Co., St Lewis, MO, USA) με ταχύτητα 400g για 30 λεπτά στους 16°C. Η πυκνή στοιβάδα που προέκυψε και περιείχε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) στο αίμα και μονοπύρηννα κύτταρα και κύτταρα του όγκου στον ασκίτη συλλέχτηκε και ακολούθησε έκπλυση του τοξικού μέσου διαχωρισμού από το κυτταρικό εναίωρημα σε αλατούχο διάλυμα (HBSS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) εις διπλούν (EIKONA 7). Ακολούθηθηκε μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων με trypan blue χρησιμοποιώντας ένα βελτιωμένο αιμοκυτταρόμετρο Newbauer. Στη συνέχεια, οι κυτταρικοί πληθυσμοί τοποθετήθηκαν σε τρυβλία κυτταρικών καλλιεργειών με θρεπτικό μέσο RPMI 1640 GlutamaxTM (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) εμπλουτισμένο με 10% θερμικά απενεργοποιημένο ορό βοός (FBS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), 50 μgml^{-1} γενταμικίνη (GIBCO BRL) και 10mM HEPES (GIBCO BRL) σε τελική συγκέντρωση 5×10^6 κύτταρα ανά ml. Σε κάθε δείγμα ασκίτικου υγρού, πραγματοποιήθηκε κυοκατάψυξη και κρυοσυντήρηση των κυττάρων του όγκου σε διάλυμα αποτελούμενο κατά 90% από θερμικά απενεργοποιημένο ορό βοός (FBS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) και 10% διμεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO, Sigma Chemical Co).



A.



B.

ΕΙΚΟΝΑ 7. Ο διαχωρισμός των κυττάρων βασίζεται στην κλίση συγκέντρωσης. Τα κύτταρα λόγω της διαφορετικής τους πυκνότητας διατάσσονται μετά την φυγοκέντρωσή τους σε διάλυμα Ficoll-Histopaque (100%) σε διαφορετικά επίπεδα. Τα ερυθρά και τα πολυμορφοπύρηννα που έχουν μεγάλο ειδικό βάρος διατάσσονται στον πυθμένα. Στην επάνω στιβάδα διατάσσονται τα μονοπύρηννα (λεμφοκύτταρα και μακροφάγα/μονοκύτταρα) στο αίμα (A) και τα μονοπύρηννα και τα καρκινικά στον ασκίτη (B). Απορροφάται η επάνω στιβάδα.

Στη συνέχεια, οι κυτταρικοί πληθυσμοί επωάστηκαν για 2 ώρες στους 37°, με 5% CO₂ σε τρυβλία, πιάτα κυτταροκαλλιέργειών των 100cm² (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) έτσι ώστε τα μονοκύτταρα να προσκολληθούν στο πλαστικό. Μόνο τα μη προσκολλημένα κύτταρα, τα οποία αποτελούνταν κατά περισσότερο από 95% από T κύτταρα (όπως μετρήθηκε στην κυτταρομετρία ροής) αναρροφήθηκαν με μια πιπέττα και επανατοποθετήθηκαν στο θρεπτικό μέσο που περιγράφηκε προηγουμένως με τελική συγκέντρωση 1x10⁶ /ml. Για σύγκριση, η απομάκρυνση των μη T κυττάρων επίσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντι-CD-3 μικροσφαιρίδια, (Miltenyi Biotec, Boston, MA, USA), μια καθιερωμένη μέθοδο που προσφέρει υψηλής ομοιογένειας κυτταρικούς πληθυσμούς. Η επιτυχής απομάκρυνση των μη CD-3 κυττάρων επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

Σε κάθε βοθρίο των πλακών κυτταροκαλλιέργειας τοποθετούνται 3x10⁶ κύτταρα. Για την διέγερση και πολλαπλασιασμό των T κυττάρων προστέθηκε κεκαθαρισμένο αντίσωμα αντι-CD3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) σε τελική συγκέντρωση 25 ng/ml και ιντερλευκίνη rIL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) σε τελική συγκέντρωση 150 IU/ml την πρώτη μέρα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια προσθέταμε 150 IU/ml rIL-2 κάθε 3-4 ημέρες. Διάρκεια καλλιέργειας 14 ημέρες. Με σκοπό να μελετηθεί η πιθανή δόσοεξαρτώμενη επίδραση του VEGF στον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, προσθέταμε ανασυνδυασμένο (recombinant) rVEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) στις καλλιέργειες κάθε 3-4 ημέρες και σε τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 20, 100 έως και 500 ng/ml. Κάθε συγκέντρωση εφαρμόστηκε σε τρία βοθρία καλλιεργητικών πλακών και η μέση τιμή χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.

Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Τα κύτταρα, στις καλλιέργειες μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα βελτιωμένο αιμοκυτταρόμετρο Newbauer κάθε 7 ημέρες και προσαρμόστηκαν στην απαιτούμενη συγκέντρωση πριν την επανατοποθέτηση στις καλλιεργητικές πλάκες. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εξετάστηκε χρησιμοποιώντας και την τεχνική ενσωμάτωσης θυμιδίνης όπως περιγράφεται παρακάτω. Με στόχο να αποκλείσουμε την λειτουργία του VEGFR-2, 1μg/ml μονοκλωνικού αντισώματος αδρανοποίησης

anti-VEGFR2 moAb ή φυσιολογικό IgG1 moAb ποντικού ως isotype control(R&D Systems, MN, USA) προστέθηκε στις καλλιέργειες στις μέρες 0, 1, 3 και κάθε τρεις μέρες στη συνέχεια.

Δοκιμασία ενσωμάτωσης ^3H -θυμιδίνης

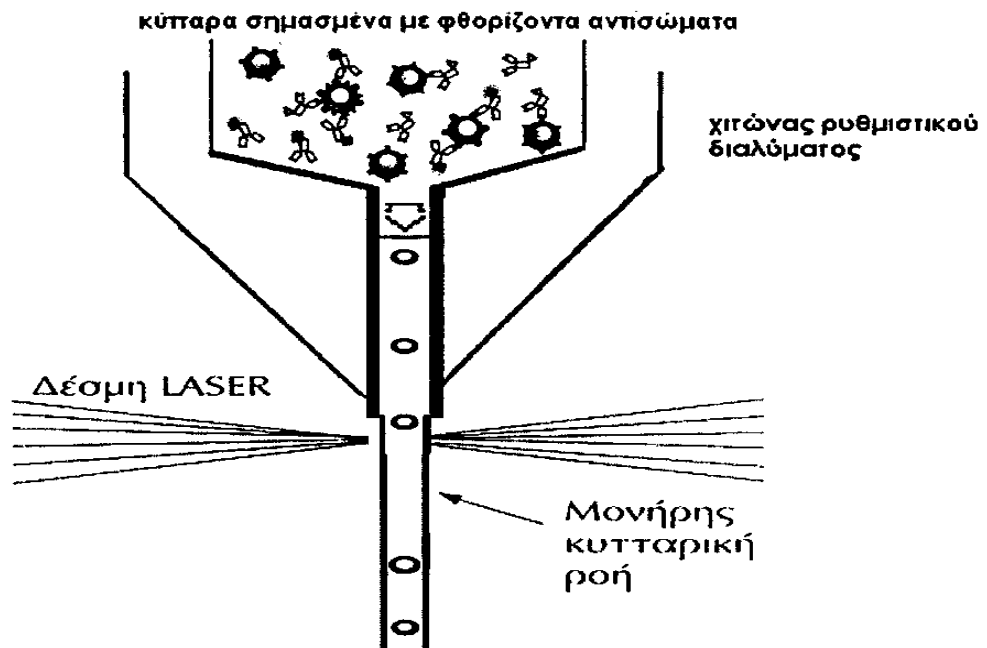
Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων επίσης εξετάστηκε χρησιμοποιώντας και την δοκιμασία ενσωμάτωσης θυμιδίνης στο Τμήμα Φυσιολογίας Ανθρώπων και Ζώων στη σχολή Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα τα T λεμφοκύτταρα αποσπάστηκαν από τις καλλιέργειες σε διάφορες χρονικές στιγμές και τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικές πλάκες 96 βοθρίων με βαθύ πάτο (Costar, Corning Inc., NY, USA) όπου επώαστηκαν για 90 ώρες με τη παρουσία ή μη διαφόρων συγκεντρώσεων του VEGF. Δημιουργήθηκαν έτσι παράλληλες καλλιέργειες T κυττάρων με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του VEGF. Τα κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς την παρουσία του VEGF χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Δεκαοχτώ ώρες πριν από τον τερματισμό της καλλιέργειας προστέθηκε 1 Ci ^3H -θυμιδίνης (Amersham, Biosciences Ltd, Buckinghamshire, UK) σε κάθε βοθρίο και τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε ένα ημι-αυτόματο συλλέκτη κυττάρων (Skatron A.E., Tranby, Νορβηγία). Η ποσότητα της ενσωματωμένης ραδιενέργειας που είναι ανάλογη με τη σύνθεση του DNA, μετρήθηκε σε έναν μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Wallac, Turku, Φινλανδία) και εκφράζονται ως μετρήσεις ανά λεπτό (cpm).

Το αποτέλεσμα που προέκυψε σε κάθε δείγμα στη συνέχεια μετασχηματίστηκε σε ποσοστό της ενσωμάτωσης ισοτόπων χρησιμοποιώντας τον τύπο: (μέσος όρος cpm δείγματος / cpm της ομάδας ελέγχου) X 100.

Κυτταρομετρία ροής

Τα καλλιιεργημένα λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν τόσο από ασκίτη όσο και από περιφερικό αίμα εξετάστηκαν ως προς την έκφραση υποδοχέων του VEGF στην κυτταρική τους μεμβράνη στις ημέρες 0, 7, 14 με την χρήση ανιχνευτή φθορίζουσών κυττάρων, με κυτταρομετρία ροής (FACS) στο Εργαστήριο της Ογκολογικής Μονάδας της Θεραπευτικής Κλινικής του ΕΚΠΑ όπως έχει περιγραφεί και σε προηγούμενες έρευνες της κλινικής (144).

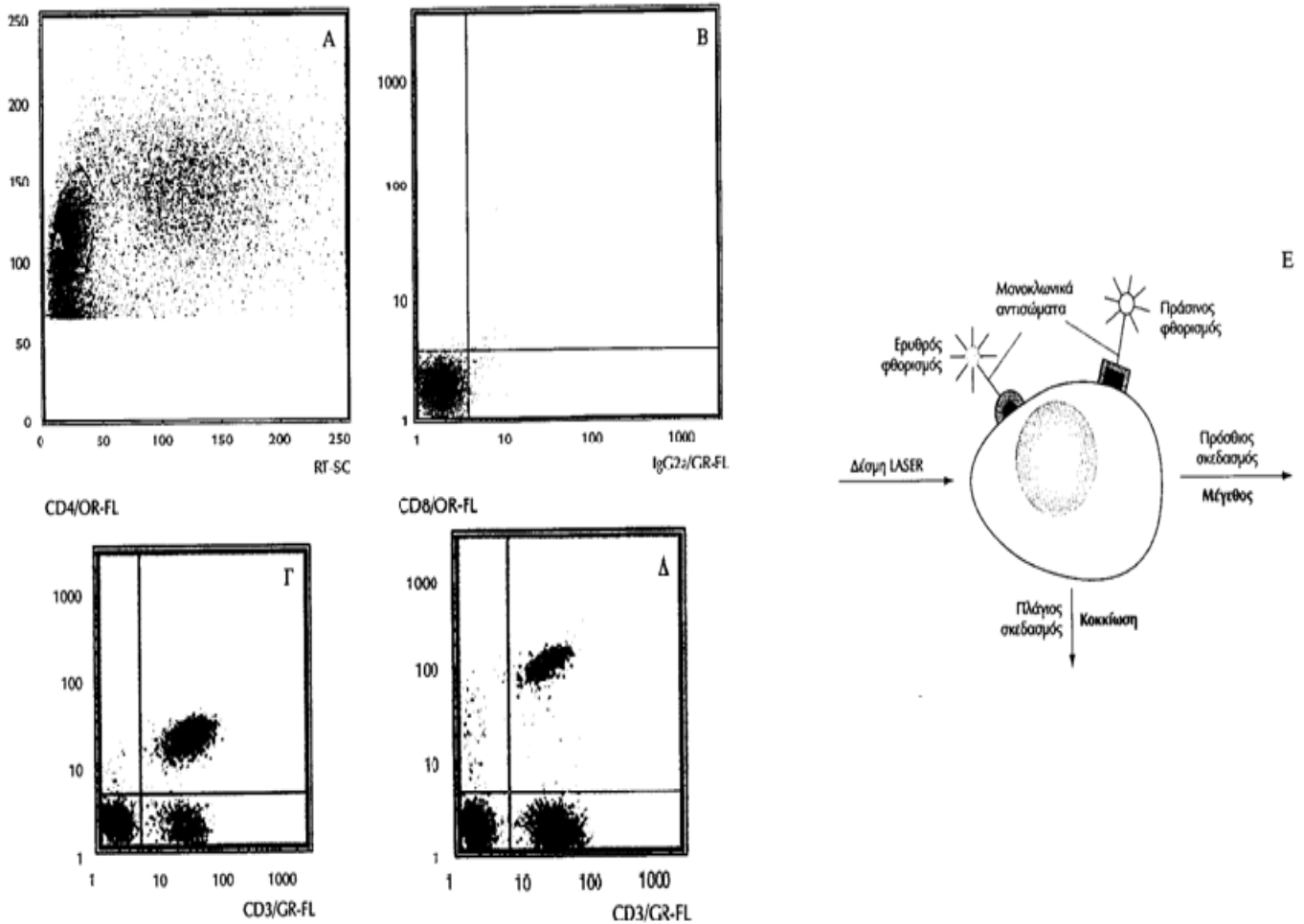
Η κυτταρομετρία ροής (EIKONA 8) είναι μια μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων που παράγονται καθώς μια μονήρης σωματιδιακή διάταξη διέρχεται μπροστά από μια φωτεινή δέσμη. Στην κλινική πράξη, η κυτταρομετρία ροής θα μπορούσε να οριστεί ως μια αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης κυττάρων ή γενικότερα σωματιδίων με βάση συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους που προσδιορίζονται άμεσα και ξεχωριστά πάνω σε καθένα από τα κύτταρα του υπό εξέταση δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την υδροδυναμική διάταξη του κυτταρικού εναιωρήματος σε ρεύμα μονήρων κυττάρων, που διασταυρώνεται κάθετα με ακτίνες LASER. Οι φυσικοχημικοί χαρακτήρες των κυττάρων ανιχνεύονται είτε ως το μέτρο της άμεσης αλληλεπίδρασης της φωτεινής δέσμης με αυτά (σκεδασμός, μέγεθος, κοκκίωση), είτε ως το αποτέλεσμα της επίδρασης του φωτός επί φθορίζουσών ουσιών με τις οποίες έχουν επισημανθεί ειδικά συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά μόρια.



Η κυψέλη ροής των κυτταρομέτρων. Η δέσμη LASER προσπίπτει κάθετα στα υπό εξέταση κύτταρα, η μονήρης διάταξη των οποίων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια υδροδυναμικού συστήματος.

ΕΙΚΟΝΑ 8. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μεθοδολογία μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων που παράγονται καθώς μια μονήρης σωματιδιακή διάταξη, διέρχεται μπροστά από μια φωτεινή δέσμη.

Η δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλαπλών παραμέτρων όπως πρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός και δύο ή τρία φθοριοχρώματα (ΕΙΚΟΝΑ 9) κατά την απλή διέλευση κάθε κυττάρου μπροστά από την φωτεινή δέσμη αυξάνει θεαματικά την αναλυτική ικανότητα και την αξιοπιστία της κυτταρομετρίας ροής σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές (μικροσκοπία). Η ταχύτητα των προσδιορισμών επιτρέπει τον έλεγχο τεράστιου αριθμού κυττάρων και την ανίχνευση πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών που ενδεχομένως εμπεριέχονται σε κάποιο εναιώρημα.

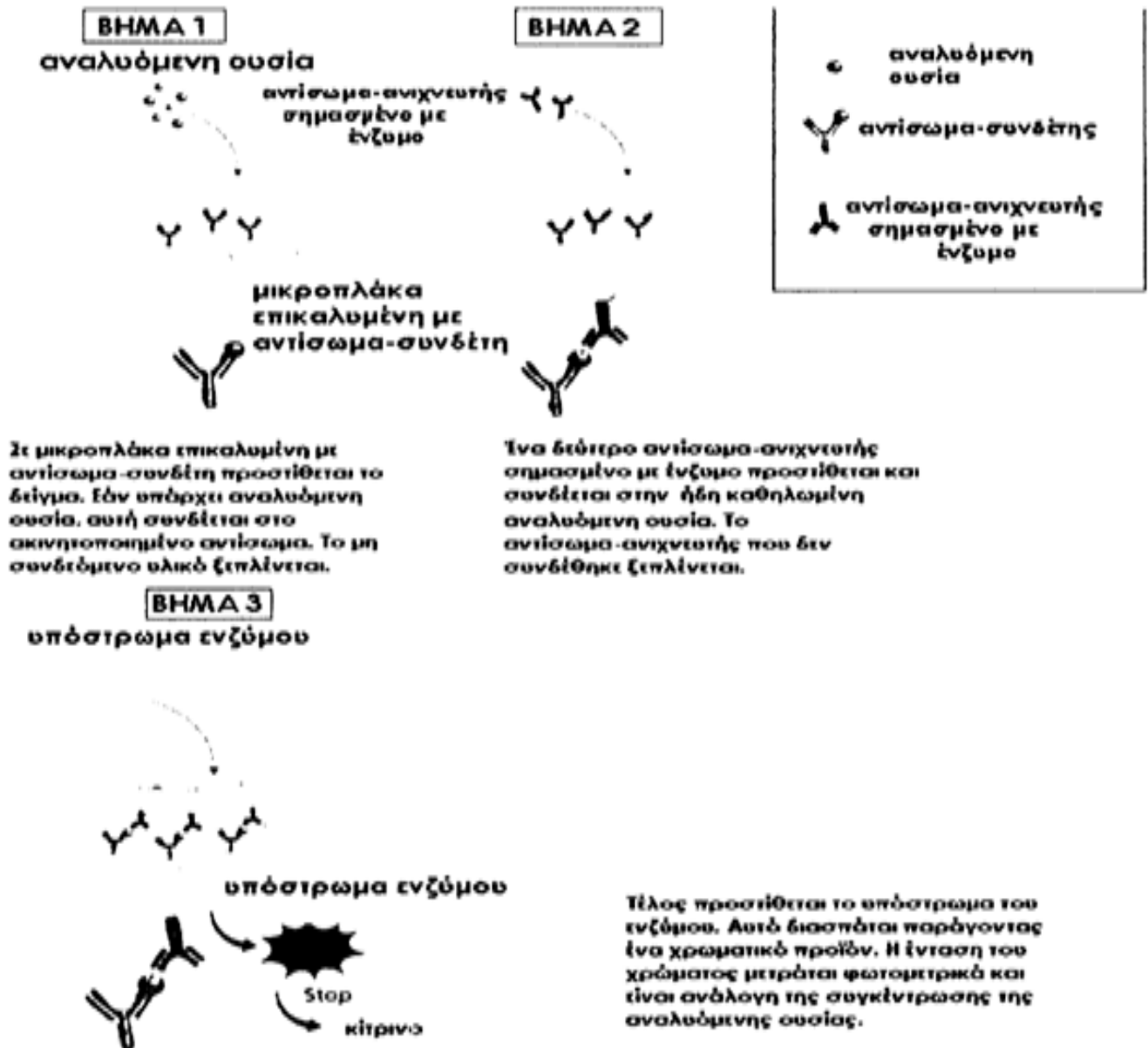


ΕΙΚΟΝΑ 9. Ταυτόχρονος προσδιορισμός τεσσάρων παραμέτρων, μετά από την πρόσπτωση της δέσμης LASER πάνω σε κάθε κύτταρο της μονήρους κυτταρικής διάταξης που διέρχεται μπροστά απ' αυτή (E). Στο πάνω σκιστόγραμμα (A) φαίνεται η κατανομή των λεμφοκυττάρων του αίματος με βάση τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά τους (πρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός) και στα κάτω η κατανομή των λεμφοκυττάρων μετά από σήμανση τους με αντι-CD-3 και αντι-CD-4 (Γ) και αντι-CD-8 (Δ) φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα. Στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο καθενός απ' αυτά τα σκιστογράμματα βρίσκονται τα αρνητικά κύτταρα και στο άνω δεξιό τα $CD3^+CD4^+$ και τα $CD3^+CD8^+$ κύτταρα αντίστοιχα. Στο άνω αριστερό τεταρτημόριο εντοπίζονται αντίστοιχα, τα $CD4^+$ και τα $CD8^+$ κύτταρα, ενώ στο κάτω δεξιό τεταρτημόριο και των δυο ιστογραμμάτων βρίσκονται τα $CD3^+$.

Εν συντομία, 10^6 κύτταρα επώστηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού αντι-ανθρώπινα εναντίον του CD3, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, με τα μονοκλωνικά αντισώματα IgG1 ποντικού να χρησιμοποιούνται ως isotype controls (BD PHARMINGEN, CA, USA) σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Εν συνεχεία, τα κύτταρα πλύθηκαν εις διπλούν σε διάλυμα έκπλυσης (PBS που περιέχει 0.5% FBS και 0.01% αλατούχο άζωτο) και μονιμοποιήθηκε με διάλυμα που περιέχει παραφορμαλδεΐδη CellFix (BD Pharmigen, CA, USA). Η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο τριών χρωμάτων φθορίωσης FACScalibur χρησιμοποιώντας λογισμικό της CellQuest (Becton-dickinson, CA, USA). Σε κάθε δοκιμασία, τουλάχιστον, 10000 αιτούμενα συμβάντα ανά συνθήκη αναλύθηκαν.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent analysis)

Τα επίπεδα του VEGF στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών μετρήθηκαν στις ημέρες 7 και 14 με την μέθοδο της ELISA χρησιμοποιώντας ένα προκαθορισμένο σύνολο αντιδραστηρίων για την ανίχνευση του VEGF, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (R&D Systems, MN, USA). (ΕΙΚΟΝΑ 10) Οι μετρήσεις έγιναν στο Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας.



ΕΙΚΟΝΑ 10. Η αρχή της ELISA.

Η ακινητοποιημένη στη στερεά φάση συνδέουσα ουσία είναι το αντίσωμα-συνδέτης. Η αναλυόμενη ουσία συνδέεται κατ' αρχήν με το αντίσωμα-συνδέτη της στερεάς φάσης και στη συνέχεια με το προστιθέμενο δεύτερο αντίσωμα-ανιχνευτή που είναι σημασμένο με κάποιο ένζυμο. Τέλος στο σύστημα προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο διασπάται παράγοντας ένα χρωματικό προϊόν. Η ένταση του χρώματος μετράται φωτομετρικά και δίνει το μέτρο της συγκέντρωσης του αναλυόμενου αντισώματος.

Ανοσοϊστοχημεία

Τα δείγματα αίματος υγιών καθώς και τα δείγματα αίματος και ασκίτη ασθενών, ελέχθησαν ανοσοϊστοχημικά τις ημέρες 0, 7 και 14 με στόχο να προσδιοριστεί η ύπαρξη των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2. Η επεξεργασία έγινε στο τμήμα Κυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αρεταίειο Νοσοκομείο. Συγκεκριμένα, τα δείγματα προετοιμάστηκαν στη φυγόκεντρο (cytospin 4, ThermoShandon) και μετά τοποθετήθηκαν στην αιθανόλη για 30 λεπτά. Μετά την επανενυδάτωση, επεξεργάστηκαν με το σύστημα ανάκτησης αντιγόνων Antigen Retrieval Citra system (Biogenx, San Ramon, California) σε κλίβανο μικροκυμάτων για 5 λεπτά στα 750W, τα αφήσαμε να κρυώσουν για 20 λεπτά σ' αυτό το διάλυμα και στη συνέχεια κάθε δείγμα πλύθηκε τρεις φορές μ' ένα διάλυμα Tris-buffer για 3 λεπτά. Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση έγινε μ' ένα αυτόματο Ventana immunostainer (Ventana NexES™, Ventana Medical Systems, Inc., Tuscon, AZ) χρησιμοποιώντας το iVIEW™ DAB selection kit (Ventana), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα επώαστηκαν είτε μ' ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού Flt-1/VEGFR1 (Neomarkers, Lab Vision Corporation) (αραίωση 1:25), είτε μ' ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού Flt-1/VEGFR2 (Santa Cruz Biotechnology) (αραίωση 1:25). Σε κάθε ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν θετικά και αρνητικά controls. Μετά από τις αρχικές πλύσεις και την προεπώαση με φυσιολογικό ορό, τα δείγματα επώαστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα για 30 λεπτά. Το ειδικό αντίσωμα τοποθετήθηκε μέσω ενός δευτερογενούς IgG-βιοτινυλιωμένου κοκτέιλ κοινών αντισωμάτων κουνελιού και ποντικού (χρόνος επώασης 8 λεπτά). Αυτό το βήμα ακολουθείται με μια σύζευξη στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (χρόνος επώασης 8 λεπτά) και οπτικοποιήθηκε ως μια καφέ κηλίδα με το χρωμογόνο διαμινοβενζιδίνη (diaminobenzidine, DAB) (χρόνος επώασης 8 λεπτά) μαζί με την ενίσχυση θειϊκού χαλκού (χρόνος επώασης 4 λεπτά). Κάθε βήμα χρήζει συγκεκριμένου χρόνου επώασης (όπως αναφέραμε παραπάνω) και καθορισμένη θερμοκρασία 37°C. Ακολουθώντας την αυτοματοποιημένη διαδικασία σήμανσης, υποβαλλόμενα και σε χρώση-μέτρηση με αιματοξυλίνη (χρόνος επώασης 4 λεπτά) τα δείγματα πλύθηκαν σε γλυαρό νερό, αφυδατώθηκαν και καλύφθηκαν.

Western Blotting

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, συλλέχθηκαν PBMCs και λεμφοκύτταρα από ασκитικό υγρό που ανεπτύχθησαν σε καλλιέργειες με την παρουσία 150 IU/ml IL-2 και 25 ng/ml anti-CD3 με ή και χωρίς την προσθήκη VEGF, από διαφορετικά χρονικά σημεία κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Η ανάλυση western blotting, έλαβε χώρα στο εργαστήριο του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Συγκεκριμένα, η λύση των κυττάρων προετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας 10×10^6 κύτταρα σε κάθε προετοιμασία. Από κάθε προετοιμασία παράχθηκαν περίπου 50μg συνολικής πρωτεΐνης, η οποία αναμίχθηκε με SDS-PAGE reducing buffer (Sigma Aldrich Ltd, UK) θερμαινόμενο στους 100°C και τοποθετήθηκε σε γέλη πολυακρυλαμίδης 7,5% (145). Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες πλέον, μεταφέρθηκαν σε ειδική μεμβράνη Trans-Blot Transfer Membrane (Bio-Rad Laboratories Ltd.) χρησιμοποιώντας τα καθορισμένα πρωτόκολλα Western Blot (145) και προσθέτοντας 1μg αντισώματος anti-FcRAb (R&D Systems, MN, USA) για να αποτρέψουμε την μη ειδική σύζευξη του αντισώματος anti-VEGFR2/KDR. Η παρουσία του VEGFR2/KDR ανιχνεύτηκε χρησιμοποιώντας 1μg κεκαθαμένου αντισώματος έναντι του ανθρώπινου VEGFR2 (R&D Systems, MN, USA) (146), το οποίο παράχθηκε σε ποντικό και επώαστηκε κατά την διάρκεια της νύχτας στους 4 °C. Οι μεμβράνες πλύθηκαν για 30 λεπτά με TBS-Tween 1% και ακολούθως επώαστηκαν με 1μg από συζευγμένου με HRP αντισώματος έναντι ποντικού (DAKO) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες τελικά πλύθηκαν με TBS-Tween 1% τέσσερις φορές από 15 λεπτά κάθε φορά και ακολούθως επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας ένα σύστημα ανάλυσης Western blotting ECL (Amersham Pharmacia Biosciences, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή με τελική έκθεση σε Fuji RX x-ray film για περίοδο 10 λεπτών.

Μέτρηση κυτταροτοξικότητας

Για να διερευνηθεί η επίδραση του VEGF στην κυτταροτοξική δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων, τα κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί στις καλλιέργειες, επεξεργάστηκαν στο Τμήμα Φυσιολογίας Ανθρώπων και Ζώων στη σχολή Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα, η κυτταροτοξική δραστηριότητα των κυττάρων στις καλλιέργειες προσδιορίστηκε μέσω μιας καθορισμένης μέτρησης απελευθέρωσης ^{51}Cr σε 4 ώρες απέναντι σε μια K562 κυτταρική σειρά η οποία είναι μια κυτταρική σειρά ανθρώπινης ερυθρομυελοβλαστικής λευχαιμίας, απέναντι σε κυτταρική σειρά Daudi, μια κυτταρική σειρά λεμφώματος Burkitt και απέναντι σε κρυοσυντηρημένα αυτόλογα κύτταρα όγκου από το ασκитικό υγρό κάθε ασθενούς . Τα κύτταρα στόχοι σημάνθηκαν με 100 μCi sodium[^{51}C] chromate (Radiochemical Centre, Amersham , Bucks, UK) για κάθε 10^6 κύτταρα στόχους για μια ώρα στους 37°C . Τα δραστικά κύτταρα επώαστηκαν με τα κύτταρα στόχους σε αναλογίες Δραστικά κύτταρα : Στόχοι 100:1, 50:1, 25:1 και 12,5:1. Μετά από 4 ώρες, απομακρύνθηκαν 100 μl υπερκειμένου κάθε βοθρίου και το ισότοπο μετρήθηκε μ' ένα γ -counter (1275 Mini-gamma LKB Wallac, Turku, Finland). Για τον καθορισμό της μέγιστης και της αυθόρμητης απελευθέρωσης ^{51}Cr τα κύτταρα στόχοι είχαν προηγουμένως επωαστεί με 3 N HCL και ένα σκέτο διάλυμα, χωρίς τα δραστικά κύτταρα. Σε όλα τα πειράματα, η αυθόρμητη λύση δεν υπερέβη το 10% της μέγιστης απελευθέρωσης. Το ποσοστό της ειδικής κυτταροτοξικότητας υπολογίστηκε όπως έχει περιγραφεί (147), σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο. Όπου cpm (count per minute), μετρήσεις ανά λεπτό.

$$\% \text{ ειδικής λύσης} = \frac{[\text{πειραματική απελευθέρωση cpm} - \text{αυθόρμητη απελευθέρωση cpm}]}{(\text{μέγιστη απελευθέρωση cpm} - \text{αυθόρμητη απελευθέρωση cpm})} \times 100$$

Στατιστική ανάλυση

Οι δοκιμασίες στατιστικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS (version 14.0). Οι διαφορές στους σχετιζόμενους πληθυσμούς κυττάρων σε διαφορετικά χρονικά σημεία αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Wilcoxon κατά ζεύγη. Οι μη παραμετρικές δοκιμασίες Kruskal-Wallis H και Mann-Whitney U χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθούν οι διάμεσες τιμές των κυτταρικών πληθυσμών στα διαφορετικά χρονικά σημεία. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας επιλέχθηκε η τιμή δυο όψεων p μικρότερη του 5%.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α) «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ (VEGF) ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΥΓΙΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΩΘΗΚΩΝ»

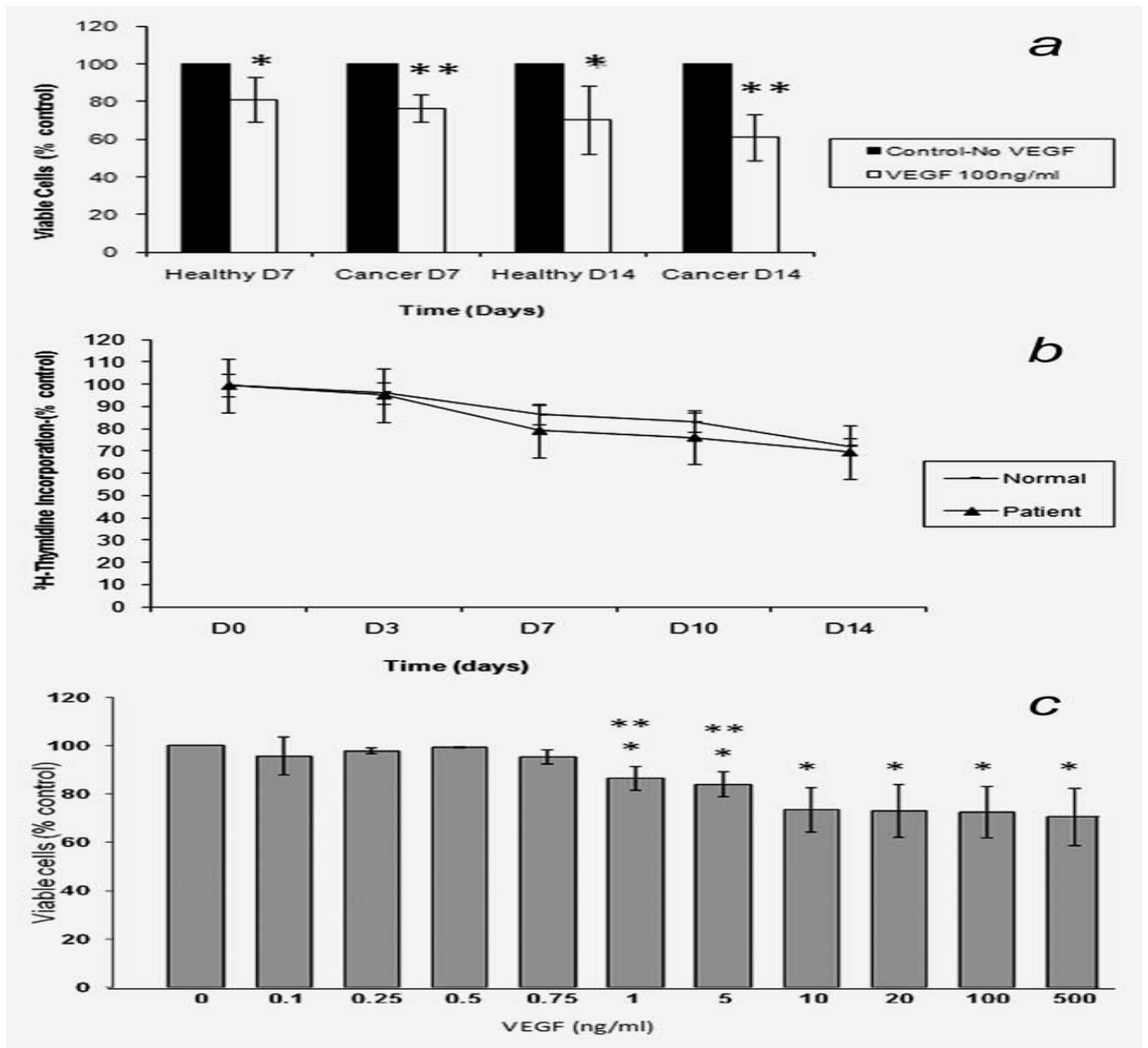
Ο VEGF καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων

Μονοπύρηννα κύτταρα συλλέχτηκαν από την περιφερική κυκλοφορία 5 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και 9 φυσιολογικών υγιών δοτριών, αποχωρίστηκαν από τα μονοκύτταρα μέσω της προσκόλλησης των μονοκυττάρων στο πλαστικό και αναπτύχθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες υπό την παρουσία IL-2 και αντι-CD3 για 14 ημέρες. Την ημέρα 14, πάνω από το 95% των κυττάρων ήταν θετικά στην έκφραση του αντιγόνου CD3 (CD3+). Την ημέρα 0, σε όλα τα δείγματα τα κύτταρα CD3+ CD56+ αποτελούσαν λιγότερο από το 3% από το συνολικό αριθμό των T κυττάρων και αύξησαν το ποσοστό τους σε πάνω από 10% την ημέρα 14, ενώ το ποσοστό των ρυθμιστικών T κυττάρων (Treg; CD4+CD25+high) παρέμεινε ίδιο (περίπου 3%). Ο λόγος των κυττάρων CD4+/CD8+ μετατοπίστηκε από την επικράτηση των CD4+ σε αναστροφή με υπεροχή των CD8+ την ημέρα 14 (Τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). Με σκοπό να εξετάσουμε εάν το ανασυνδυασμένο (recombinant) VEGF επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, προσθέσαμε 100 ng/ml rVEGF στις καλλιέργειες κάθε 3-4 ημέρες και τα κύτταρα καταμετρήθηκαν στις ημέρες 7 και 14. Σημειώθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση στον απόλυτο αριθμό των T κυττάρων, την ημέρα 14 στις καλλιέργειες που προσθέσαμε τον VEGF τόσο στις καλλιέργειες δειγμάτων από υγιείς δότριες (Wilcoxon $p=0.012$) όσο και στις καλλιέργειες δειγμάτων καρκινοπαθών (Wilcoxon $p=0.043$), (EIKONA 11a). Τα δεδομένα πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις διάφορες χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια των 14 ημερών της καλλιέργειας, υποδεικνύουν πως τόσο για τις καλλιέργειες κυττάρων ασθενών όσο και υγιών δοτριών, η μεγαλύτερη καταστολή εξαιτίας του VEGF παρατηρήθηκε την ημέρα 14 (EIKONA 11b). Για αυτό το λόγο, όλα τα δεδομένα που προέκυψαν αναφέρονται στην ημέρα 14 εκτός κι αν επισημαίνεται κάτι διαφορετικό. Ο βαθμός της καταστολής πολλαπλασιασμού ήταν παρόμοιος ανάμεσα στους διάφορους υποπληθυσμούς των T κυττάρων. (Τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις καλλιέργειες δειγμάτων από υγιείς και καρκινοπαθείς στις ημέρες 7 και 14 τόσο σ' αυτές που προστέθηκε ο VEGF (Mann-Whitney $p=0.147$ και $p=0.190$) όσο και σ' αυτές που δεν προστέθηκε (Mann-Whitney $p=0.147$ και $p=0.364$). Για αυτό το λόγο, αυτά τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν και ενοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

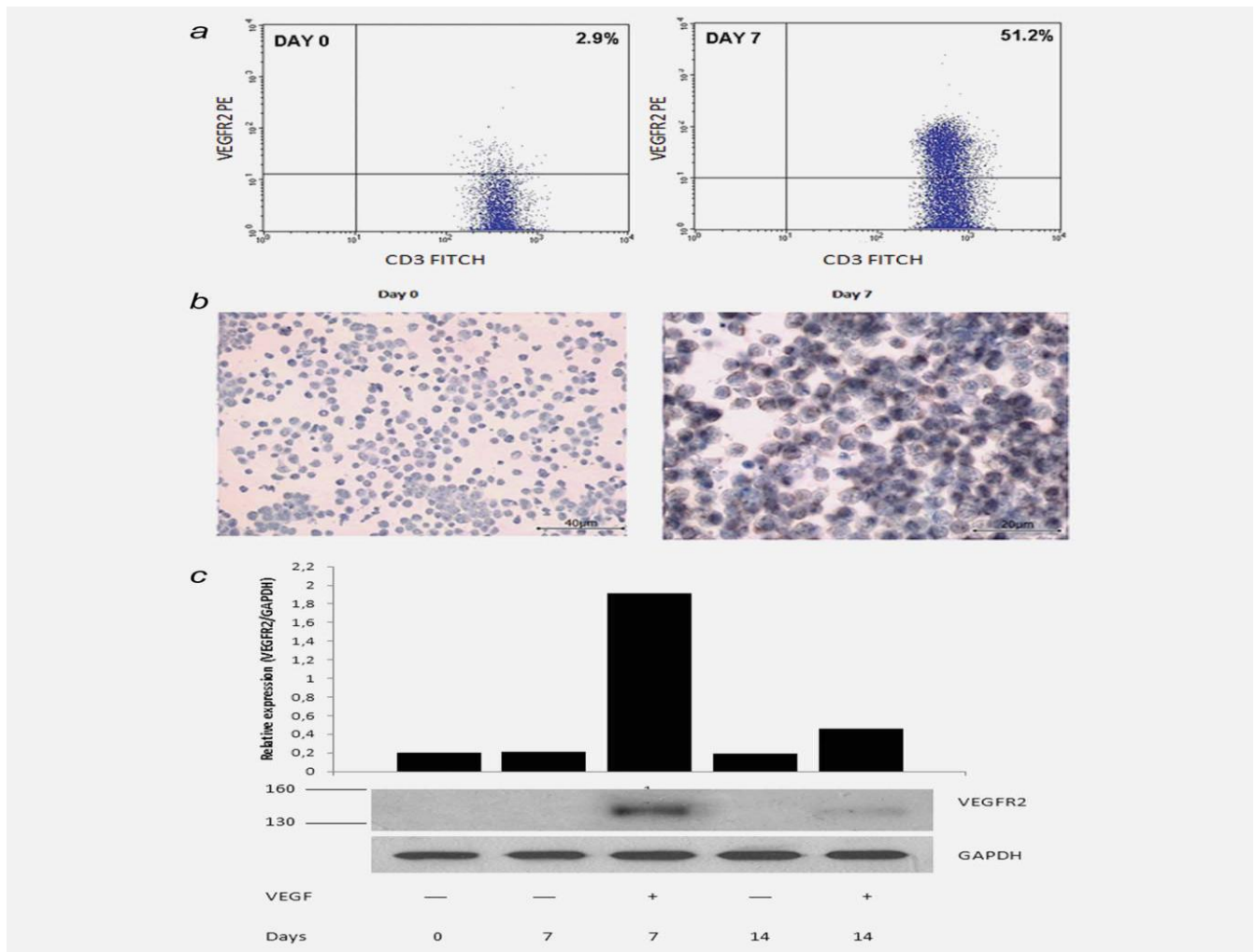
Με σκοπό να μελετήσουμε εάν αυτή η καταστολή είναι δόσο-εξαρτώμενη, προσθέσαμε rVEGF σε διαφορετικές συγκεντρώσεις από 0.1 έως και 500 ng/ml σε καλλιέργειες T κυττάρων για 14 ημέρες, 6 ατόμων (ΕΙΚΟΝΑ 11c). Οι συγκεντρώσεις του rVEGF μεγαλύτερες από 10ng/ml αναστείλαν τον πολλαπλασιασμό κατά 30%. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν λιγότερο εμφανές σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε ακόμη και σε συγκεντρώσεις 1 και 5 ng/ml. Αποτέλεσμα που δείχνει πως καταστολή των T κυττάρων μπορεί να επάγεται και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του VEGF που μιμούνται τις φυσιολογικές συνθήκες.

Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκφράζουν τον VEGFR-2

Με σκοπό να διαπιστώσουμε την έκφραση των διαφόρων τύπων υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος που αναπτύχθηκαν με την παρουσία του αντι-CD3 και IL-2, τα λεμφοκύτταρα από 6 άτομα αναλύθηκαν ως προς την έκφραση των υποδοχέων του VEGF 1,2 και 3 με μέσα όπως κυτταρομετρία ροής, ανοσοϊστοχημεία και ανάλυση Western blott. Δεν ανιχνεύθηκαν υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-3 (Τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). Όπως απεικονίζεται στην ΕΙΚΟΝΑ 12a, μόνο η έκφραση του VEGFR-2 ανιχνεύτηκε στην επιφάνεια των CD3⁺ T κυττάρων. Ειδικότερα την ημέρα 0 ελάχιστη έκφραση του VEGFR-2 ανιχνεύτηκε (<5%), ενώ την ημέρα 7 της καλλιέργειας, το ποσοστό των καλλιεργούμενων κυττάρων που εξέφρασαν τον VEGFR-2 στην επιφάνεια τους ήταν 50-80%. Σε 2 περιπτώσεις, υπήρξε μια μείωση στην έκφραση του VEGFR-2 την 14 ημέρα ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις η έκφραση παρέμεινε ουσιαστικά αμετάβλητη. Η έκφραση του VEGFR-2 δεν σχετίζεται με κάποιον συγκεκριμένο υποπληθυσμό των T κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ανοσοϊστοχημεία και ανάλυση Western Blot (Εικόνα 12b και 12c).



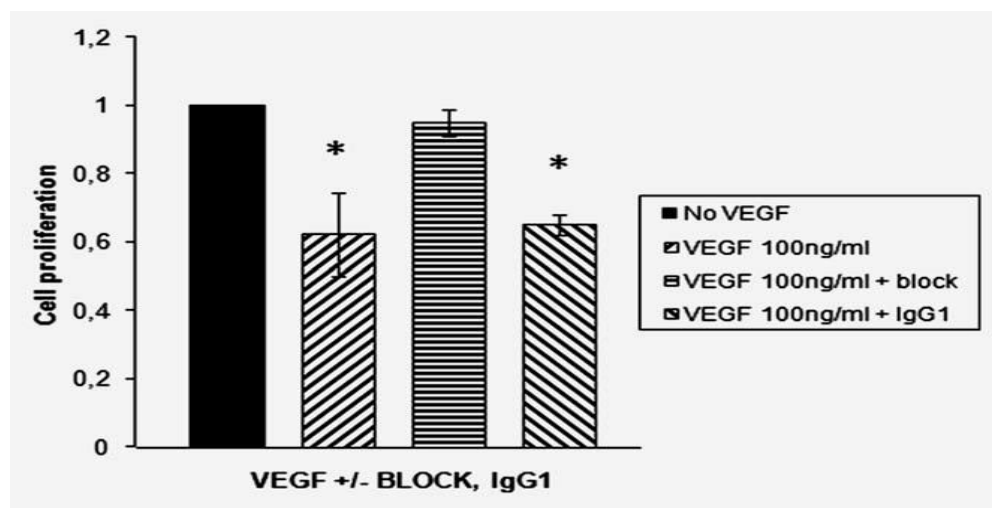
ΕΙΚΟΝΑ 11. Ο VEGF καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T κύτταρων περιφερικού αίματος. (a) Τα κύτταρα από υγιείς δότριες (n=9) και καρκίνο ωοθηκών (n=5) επωάστηκαν για 7 και 14 μέρες με 100ng/ml rVEGF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος των κυττάρων που έχουν εκτεθεί στον VEGF προς τα κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί (controls). *p=0.012;**p=0.043. Οι τιμές p σύγκρισης των μετρήσεων των κυττάρων των δυο ομάδων υπολογίστηκε με τη δοκιμασία Wilcoxon κατά ζεύγη. (b) Η καταστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων οφειόμενη στο VEGF (100 ng/ml) κατά την διάρκεια της καλλιέργειας (0-14 μέρες) σύμφωνα με την δοκιμασία πρόσληψης ³H-θυμιδίνης. Παρουσιάζονται τα ενοποιημένα δεδομένα από 3 υγιείς δότριες και δυο ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών. (c) Δοσο-εξαρτώμενη καταστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων εξαιτίας του VEGF (0.1-500 ng/ml). Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετρήθηκε την 14^η ημέρα. Παρουσιάζονται ενοποιημένα δεδομένα (n=6). *Στατιστικά σημαντικό (p<0.05) σε σχέση με το control;** Στατιστικά σημαντικό (p<0.05) σε σχέση με συγκέντρωση 10 ng/ml.



ΕΙΚΟΝΑ 12. Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν τον VEGFR-2. (a) Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα (από τα 6 που εκτελέστηκαν), των T κυττάρων υγιούς δότριας μετά από καλλιέργεια 7 ημερών με την προσθήκη αντι-CD-3 και IL-2. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με επιλεγμένο πληθυσμό τα CD3⁺ κύτταρα. Την ημέρα 7 παρατηρείται αυξημένη έκφραση του VEGFR-2. (b) Εικόνες ανοσοϊστοχημείας όπου φαίνεται η αυξημένη έκφραση του VEGFR-2 στην επιφάνεια των T κυττάρων (καφέ χρώμα) την ημέρα 7 σε σχέση με την ημέρα 0 (αρνητικό). (c) Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου Western blot για μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) που εκφράζουν των VEGFR-2. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και διεγέρθηκαν προς πολλαπλασιασμό με ιντερλευκίνη IL-2 και αντίσωμα αντι-CD3 με την προσθήκη ή μη του VEGF (Βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). Τα κύτταρα συλλέχτηκαν την ημέρα 7 και την ημέρα 14 της καλλιέργειας. Κύτταρα από την ημέρα 0 επίσης συλλέχτηκαν. Ο VEGFR-2 είναι ανιχνεύσιμος την ημέρα 7 της κυτταροκαλλιέργειας με αύξηση του περίπου στα 130-140 kDa και αρκετά εξασθενημένη μάλιστα παρατηρήθηκε την ημέρα 14. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control. Όλα τα μεγέθη που εμφανίζονται είναι σε kDa. Απεικονίζεται η μέτρηση πυκνότητας πάνω από τις μπάντες. Το εικονιζόμενο πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από τουλάχιστον τρία με όμοια αποτελέσματα.

Ο VEGF καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων μέσω του VEGFR-2

Με σκοπό να καθορίσουμε εάν ο VEGF υποκινεί την καταστολή του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων μέσω της σύνδεσης του στον VEGFR-2, προσθέσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα αδρανοποίησης anti-VEGFR2 mAb στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, 5 ατόμων σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Η προσθήκη του αντισώματος αυτού αποκατέστησε πλήρως την καταστολή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων που υποκινεί ο VEGF, ενώ η χρησιμοποίηση ενός μη ειδικού αντισώματος του ίδιου ισotyπου δεν παράγει κάποια προστασία έναντι στην επίδραση του VEGF (ΕΙΚΟΝΑ 13). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η κατασταλτική δράση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου στα Τ κύτταρα ασκείται μέσω του υποδοχέα VEGFR-2 που εκφράζεται κατά την ενεργοποίηση τους.



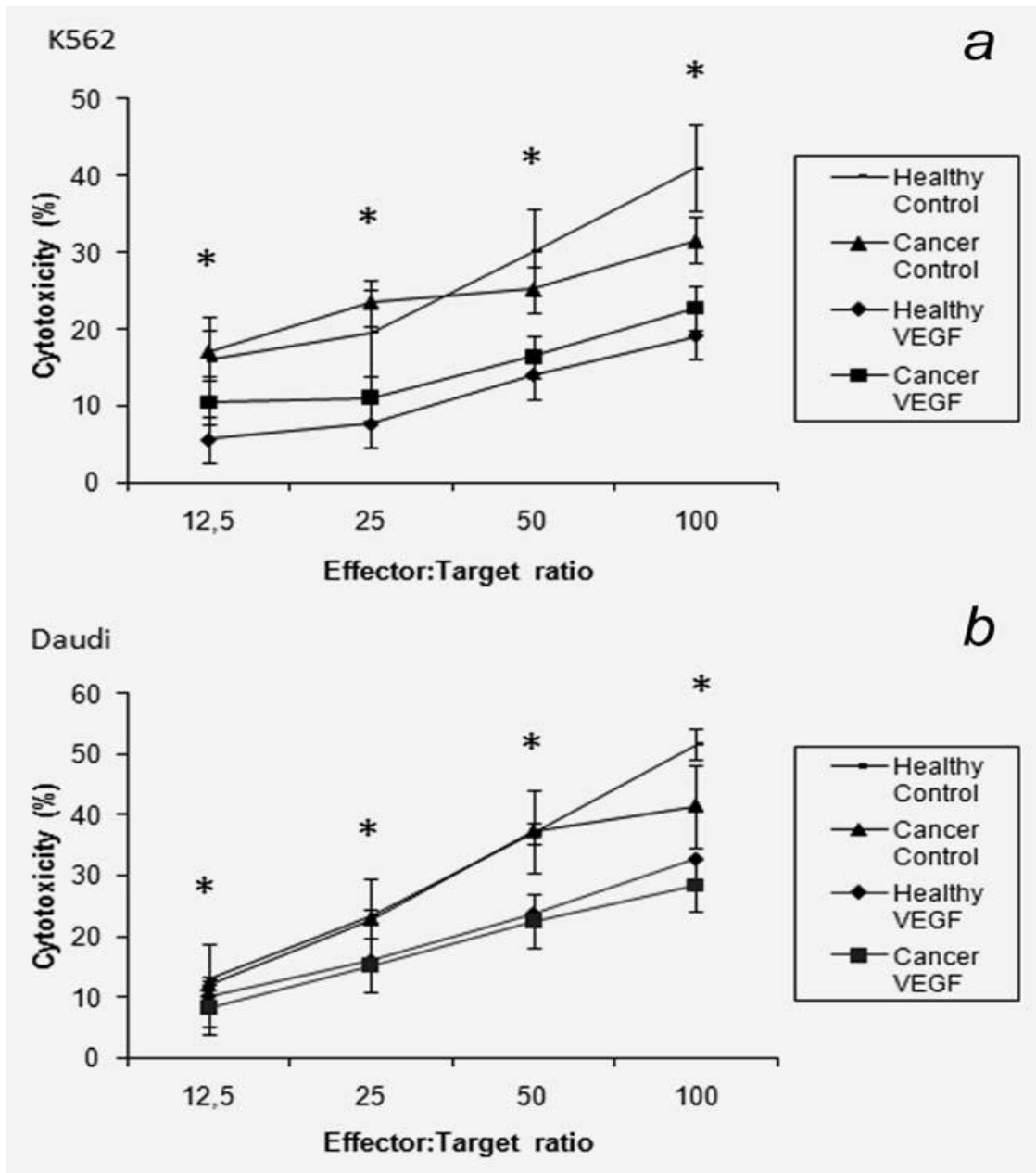
ΕΙΚΟΝΑ13. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Anti-VEGFR-2 ανέστρεψε την καταστολή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων που υποκινεί ο VEGF. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αδρανοποίησης anti-VEGFR2 mAb (block) ή ένα μη ειδικό αντίσωμα του ίδιου ισotyπου (IgG1) προστέθηκε στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων (n=5) με παρουσία VEGF (100ng/ml), σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml για 14 ημέρες. *p=0.043 συγκρινόμενο με το control.

Ο VEGF εκκρίνεται από ενεργοποιημένα T κύτταρα

Με σκοπό να εξετάσουμε εάν τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκκρίνουν VEGF, συλλέξαμε T κύτταρα από δείγματα περιφερικού αίματος 3 φυσιολογικών δοτριών και τα αναπτύξαμε σε καλλιέργειες με την παρουσία αντι-CD3 και IL-2 για 14 ημέρες. Τα επίπεδα του VEGF στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών μετρήθηκαν με την μέθοδο της ELISA σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Διαπιστώθηκε μια σημαντική αύξηση στην ποσότητα του διαλυτού VEGF από την ημέρα 7 στην ημέρα 14 (Μέσες τιμές : 55,3 [SE 30] έναντι 192 [SE 40] pg/ml, $p=0.042$). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τα ενεργοποιημένα T κύτταρα έχουν την δυνατότητα να εκκρίνουν VEGF στο περιβάλλον της καλλιέργειας.

Ο VEGF μειώνει την κυτταροτοξική δραστηριότητα των T κυττάρων

Απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα τριών υγιών δοτριών και δυο ασθενών με καρκίνο ωοθηκών λεμφοκύτταρα σύμφωνα την διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα μη προσκολλημένα στο πλαστικό λεμφοκύτταρα την ημέρα έναρξης της καλλιέργειας εξετάστηκαν για την κυτταροτοξική δραστηριότητα τους, την λύση των κυττάρων στόχων μιας K562 κυτταρικής σειράς και μιας κυτταρικής σειράς Daudi, η οποία ήταν ελάχιστη ($\leq 10\%$). Η επώαση των κυττάρων με anti-CD3 και IL-2 αύξησαν την κυτταροτοξικότητα τους απέναντι και στα δύο είδη κυττάρων στόχων κατά τέσσερις φορές στην μεγαλύτερη αναλογία δραστικών κυττάρων προς κύτταρα στόχους που εξετάστηκε. Η προσθήκη του VEGF (5ng/ml) επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των T κυττάρων ($p=0.043$) το οποίο ήταν εμφανές και στα δυο είδη κυττάρων στόχων και σε όλες τις αναλογίες δραστικών προς κύτταρα στόχους που εξετάστηκαν (ΕΙΚΟΝΑ 14). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στην κυτταροτοξικότητα των κυττάρων υγιών δοτριών και ασθενών με καρκίνο ωοθηκών τόσο στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με την προσθήκη του VEGF όσο και σ' αυτές χωρίς .



ΕΙΚΟΝΑ 14. Ο VEGF καταστέλλει την κυτταροτοξικότητα των T κυττάρων. Λεμφοκύτταρα από υγιείς δότριες (n=3) και ασθενείς με καρκίνο ωθηκών (n=2) επωάστηκαν με αντι-CD-3 και IL-2 για 14 ημέρες με την παρουσία του VEGF (5 ng/ml) ή μη. Εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητά τους απέναντι σε κύτταρα στόχους K562 (a) και Daudi (b) σε ποικίλες αναλογίες δραστικών κυττάρων προς κύτταρα στόχους. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές σε εκατοστιαία κλίμακα \pm SD. *p < 0.05 για σύγκριση της κυτταροτοξικότητας ανάμεσα στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με την παρουσία VEGF σε σχέση με το control. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ενοποιημένα δεδομένα.

**B) «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ
ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ (VEGF) ΣΤΟΥΣ
ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΑΣΚΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ
ΩΟΘΗΚΩΝ»**

Ο VEGF καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων

Δείγματα ασκίτικού υγρού από 15 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη και επιλέχθηκαν με κριτήριο την χαμηλή περιεκτικότητα σε NK και B κύτταρα (<3-4%). Τα μονοπύρρηνα κύτταρα αποχωρίστηκαν από τα μονοκύτταρα μέσω της προσκόλλησης των μονοκυττάρων στο πλαστικό και αναπτύχθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες υπό την παρουσία IL-2 και αντι-CD3 για 14 ημέρες. Την ημέρα 14, πάνω από το 95% των κυττάρων ήταν θετικά στην έκφραση του αντιγόνου CD3 (CD3+). Υπήρξε μια σταδιακή μείωση των CD4+ κυττάρων (και αντίστοιχη αύξηση των CD8+ κυττάρων) από μια βασική μέση τιμή 58.4% (s.e. 5.2) σε 37.7% (s.e. 7.2) την ημέρα 14. (P=0.036) Την ημέρα 0, σε όλα τα δείγματα ο υποπληθυσμός των ρυθμιστικών T κυττάρων (Tregs; CD4+CD25^{high}) ήταν χαμηλός (<3%), αλλά αυξήθηκε σημαντικά από μια βασική μέση τιμή 0.95% (s.e. 0.22) σε 3.2% (s.e. 0.59) την ημέρα 14. (P=0.012). Τα CD3+CD56+ κύτταρα αποτελούσαν ≤ 6% του αρχικού πληθυσμού των T κυττάρων και δεν επέδειξαν κάποιο σταθερή τάση αύξησης μέχρι την ημέρα 14. Πανομοιότυπες αλλαγές παρατηρήθηκαν τόσο στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν χωρίς την παρουσία του VEGF όσο και αυτές αναπτύχθηκαν με την in vitro παρουσία του VEGF. Γεγονός που δεικνύει πως αυτό ήταν αποτέλεσμα των συνθηκών της καλλιέργειας και δεν προκλήθηκε εξαιτίας της δράσης του VEGF.

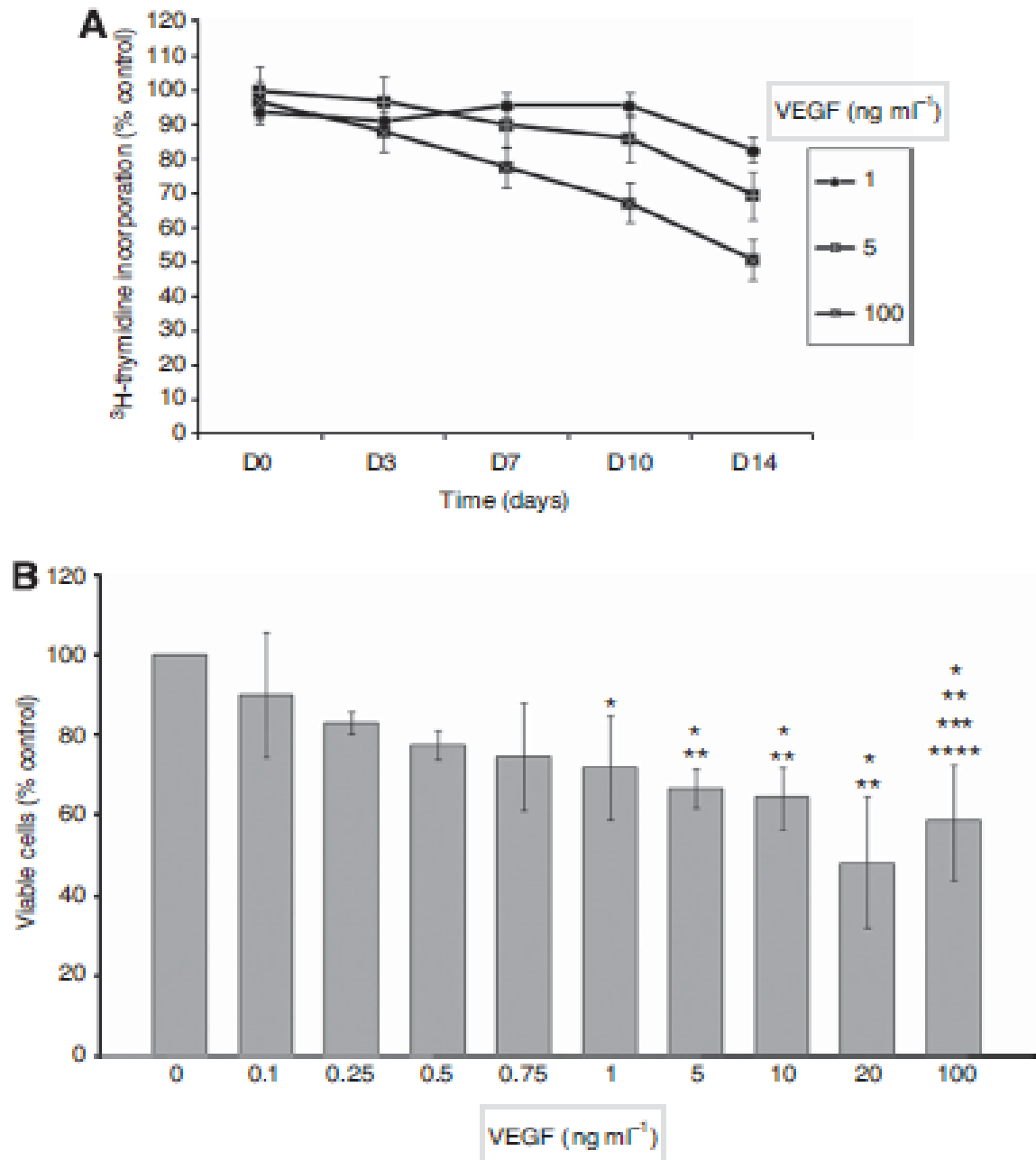
Με σκοπό να εξετάσουμε εάν το ανασυνδυασμένο (recombinant) VEGF επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, προσθέσαμε rVEGF σε συγκεντρώσεις από 0.1 έως 100 ngml⁻¹ στις καλλιέργειες κάθε 3-4 ημέρες και τα κύτταρα καταμετρήθηκαν κάθε 2-3 ημέρες μέχρι την ημέρα 14. Τα δεδομένα πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις διάφορες χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια των 14 ημερών της καλλιέργειας T κυττάρων από 3 ασθενείς, υποδεικνύουν πως η μεγαλύτερη καταστολή εξαιτίας του VEGF παρατηρήθηκε την ημέρα 14. (EIKONA 15A)

Με σκοπό να επιβεβαιώσουμε την κατασταλτική δράση του ανασυνδυασμένου (recombinant) VEGF στον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, T κύτταρα από 10 ασθενείς καλλιεργήθηκαν με την παρουσία rVEGF σε συγκεντρώσεις όμοιες με αυτές που αναφέρθηκαν προηγουμένως και τα κύτταρα καταμετρήθηκαν τις ημέρες 7 και 14. Παρατηρήθηκε μια δοσο-εξαρτώμενη

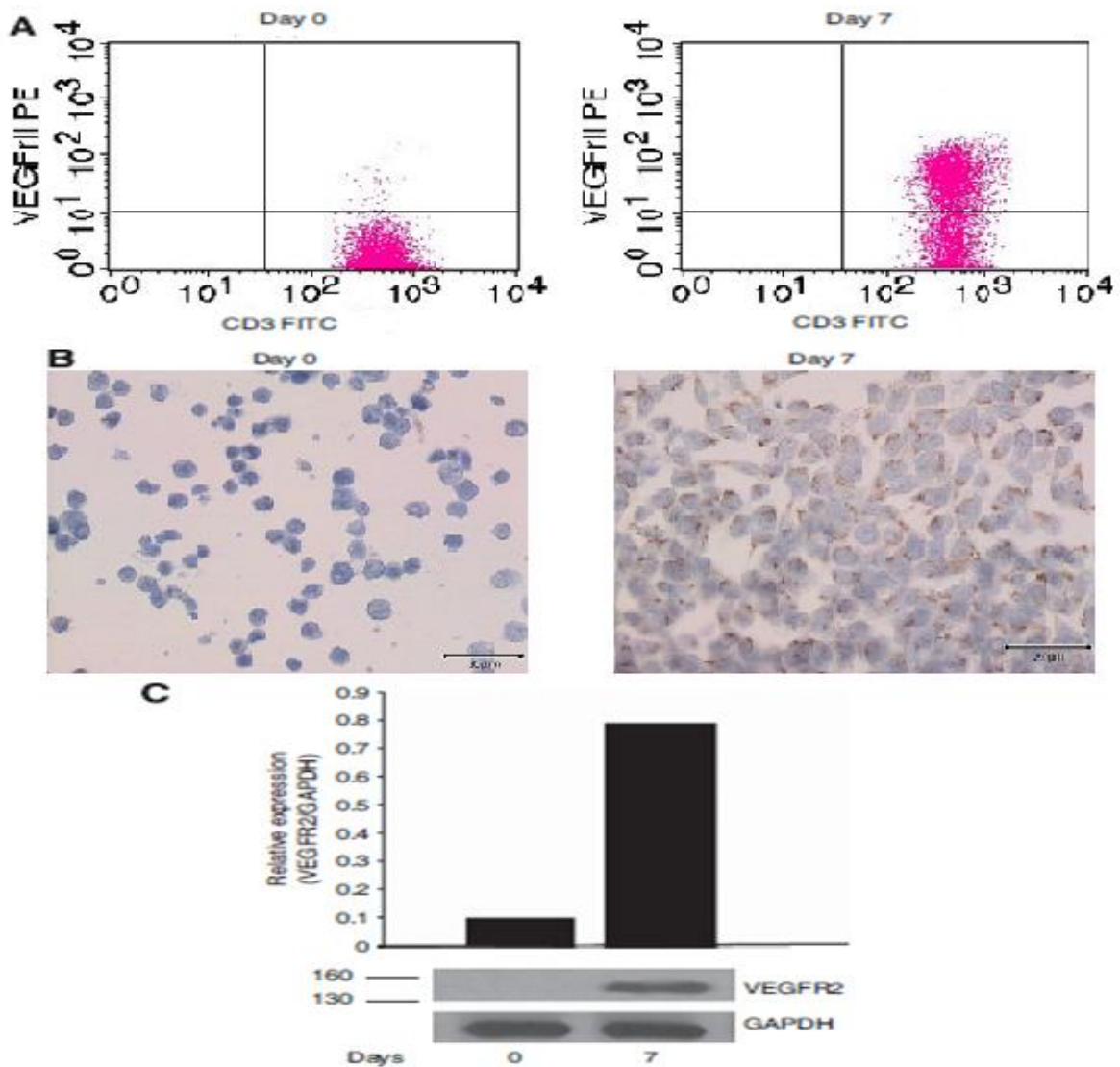
κατασταλτική δράση του VEGF στον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, η οποία ήταν εμφανής τόσο την ημέρα 7 (Τα δεδομένα δεν εμφανίζονται), όσο και την ημέρα 14 (EIKONA 15B). Ενώ οι συγκεντρώσεις του VEGF $\geq 1 \text{ ngml}^{-1}$ κατέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 25-50%. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα την συγκέντρωση 100 ngml^{-1} και τις συγκεντρώσεις 1,5,10 και 20 ngml^{-1} rVEGF. ($P < 0.05$) καθώς επίσης ανάμεσα την συγκέντρωση 1 ngml^{-1} και άλλες μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ο βαθμός καταστολής του πολλαπλασιασμού ήταν όμοιος ανάμεσα διάφορους υποπληθυσμούς των T κυττάρων. (Τα δεδομένα δεν εμφανίζονται)

Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκφράζουν τον VEGFR-2

Με σκοπό να διαπιστώσουμε την έκφραση των διαφόρων τύπων υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα που αναπτύχθηκαν με την παρουσία του αντι-CD3 και IL-2, τα λεμφοκύτταρα από ασκίτη 5 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών αναλύθηκαν ως προς την έκφραση των υποδοχέων του VEGF 1, 2 και 3 με μέσα όπως κυτταρομετρία ροής, ανοσοϊστοχημεία και ανάλυση Western blott. Αν και δεν ανιχνεύθηκαν υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-3 (Τα δεδομένα δεν εμφανίζονται), η έκφραση του VEGFR-2 ανιχνεύτηκε στην επιφάνεια των CD3⁺ T κυττάρων (EIKONA 16A). Ειδικότερα την ημέρα 0 ελάχιστη έκφραση του VEGFR-2 ανιχνεύτηκε, <5% των κυττάρων εξέφρασαν τον VEGFR-2, ενώ την ημέρα 7 της καλλιέργειας, το ποσοστό των καλλιεργούμενων κυττάρων που εξέφρασαν τον VEGFR-2 στην επιφάνεια τους αυξήθηκε σε 61-87%. Ο δεύτερος υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου εκφράστηκε ανεξάρτητα από την παρουσία του ανασυνδυασμένου (recombinant) VEGF σε οποιαδήποτε συγκέντρωση στις καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων, γεγονός που αποδεικνύει πως η έκφραση του ήταν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των T-κυττάρων και δεν υποκινήθηκε από τον VEGF. Η έκφραση του VEGFR-2 δεν σχετίστηκε με κάποιον συγκεκριμένο υποπληθυσμό των T κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ανοσοϊστοχημεία και ανάλυση Western Blot (Εικόνα 16B και 16C).



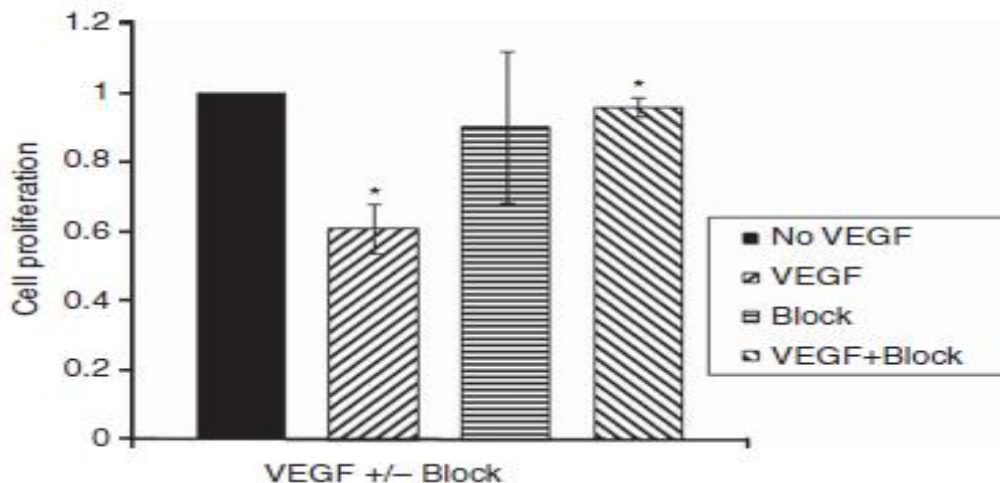
ΕΙΚΟΝΑ 15. Ο αυξητικός παράγον του αγγειακού ενδοθηλίου καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων που απομονώθηκαν από ασκτικό υγρό. **(Α)** Η καταστολή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων που οφείλεται στην δράση του VEGF (0.1- 100 ngml⁻¹) σε διάφορες χρονικές στιγμές της καλλιέργειας (0-14 μέρες) όπως προσδιορίστηκε με την δοκιμασία πρόσληψης θυμιδίνης. **(Β)** Η δοσοεξαρτώμενη κατασταλτική δράση του VEGF (0.1- 100 ngml⁻¹) στον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων. Η κυτταρική ανάπτυξη μετρήθηκε την 14^η μέρα της καλλιέργειας. Παρατίθενται ενοποιημένα δεδομένα (n=15). Οι αστερίσκοι δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (P<0.05) σε σχέση με το control (*), 1 ngml⁻¹ (**), 5 ngml⁻¹ (***) και 10 ngml⁻¹ (****).



ΕΙΚΟΝΑ 16. Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκφράζουν τον VEGFR-2. (A) Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κυτταρομετρία ροής από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα με T κυττάρων που προήλθαν από το ασκитικό υγρό μιας ασθενούς με καρκίνο ωοθηκών και καλλιεργήθηκαν με την παρουσία αντι-CD-3 και IL-2 για 7 ημέρες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με επιλεγμένο πληθυσμό τα CD3⁺ κύτταρα. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση του VEGFR-2. (B) Παρουσιάζονται εικόνες ανοσοϊστοχημείας που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του VEGFR-2 (καφέ χρώμα) την ημέρα 7 σε σχέση με την ημέρα 0. (C) Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western Blot T κυττάρων που προήλθαν από ασκитικό υγρό και εκφράζουν τον VEGFR-2. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και διεγέρθηκαν προς πολλαπλασιασμό με ιντερλευκίνη IL-2 και αντίσωμα αντι-CD3 με την προσθήκη ή μη του VEGF (Βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν την ημέρα 0 και την ημέρα 7 της καλλιέργειας. Ο VEGFR-2 είναι ανιχνεύσιμος την ημέρα 7 της κυτταροκαλλιέργειας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control. Απεικονίζεται η μέτρηση πυκνότητας πάνω από τις μάντες. Το εικονιζόμενο πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από τουλάχιστον τρία με όμοια αποτελέσματα.

Ο VEGF καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων μέσω του VEGFR-2

Με σκοπό να καθορίσουμε εάν ο VEGF υποκινεί την καταστολή του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων μέσω της σύνδεσης του στον VEGFR-2, προσθέσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα αδρανοποίησης anti-VEGFR2 mAb στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων από ασκτικό υγρό 5 ασθενών με καρίνο ωοθηκών σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Η προσθήκη του αντισώματος αυτού αποκατέστησε πλήρως την καταστολή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων που υποκινεί ο VEGF ακόμη και όταν τα Τ κύτταρα καλλιεργήθηκαν με την παρουσία της μεγαλύτερης συγκέντρωσης rVEGF που χρησιμοποιήθηκε (100ngml⁻¹) (ΕΙΚΟΝΑ 17). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η κατασταλτική δράση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου στα Τ κύτταρα ασκείται μέσω του υποδοχέα VEGFR-2 που εκφράζεται κατά την ενεργοποίησή τους.



ΕΙΚΟΝΑ 17. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Anti-VEGFR-2 ανέστρεψε την καταστολή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων που υποκινεί ο VEGF. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αδρανοποίησης anti-VEGFR2 mAb (block) προστέθηκε στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων (n=5) με παρουσία VEGF (100ng/ml), σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml για 14 ημέρες. *P=0.043 συγκρινόμενο με το control.

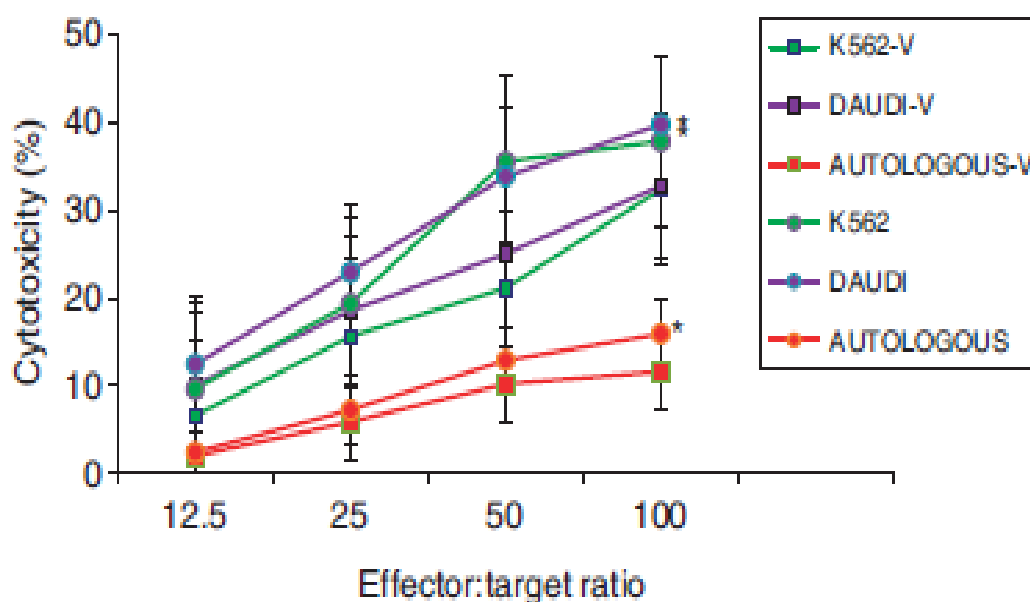
Ο VEGF εκκρίνεται από ενεργοποιημένα T κύτταρα

Με σκοπό να εξετάσουμε εάν τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκκρίνουν VEGF, συλλέξαμε T κύτταρα από δείγματα ασκτικού υγρού 3 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και τα αναπτύξαμε σε καλλιέργειες με την παρουσία αντι-CD3 και IL-2 για 14 ημέρες. Τα επίπεδα του VEGF στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών μετρήθηκαν με την μέθοδο της ELISA τις ημέρες 7 και 14. Διαπιστώθηκε μια μείωση στην ποσότητα του διαλυτού VEGF από την ημέρα 7 στην ημέρα 14. (Μέσες τιμές : 535 [SE 439] έναντι 194 [SE 94] pgml^{-1} , $P=0.467$). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τα ενεργοποιημένα T κύτταρα έχουν την δυνατότητα να εκκρίνουν VEGF στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η μέση τιμή του VEGF στα δείγματα ασκτικού υγρού των ίδιων ασθενών ήταν 1873pgml^{-1} και αυτά τα υψηλά επίπεδα του VEGF στα δείγματα ασκτικού υγρού δεν σχετίστηκαν με το ποσό του VEGF που μετρήθηκε στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των T κυττάρων ($P=0.299$ και $P=0.117$, για τις ημέρες 7 και 14, αντίστοιχα).

Ο VEGF μειώνει την κυτταροτοξική δραστηριότητα των T κυττάρων

Για να αξιολογηθεί η δοσο-εξαρτώμενη δράση του VEGF στην κυτταροτοξικότητα των T κυττάρων, ποικίλες συγκεντρώσεις rVEGF ($0.1-100 \text{ngml}^{-1}$) προστέθηκαν επανειλημμένως σε T κύτταρα από δείγματα ασκτικού υγρού 5 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών που καλλιιεργήθηκαν όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για 14 ημέρες. Για τη στατιστική ανάλυση τα δεδομένα από όλους τους λόγους δραστικά κύτταρα : κύτταρα στόχοι ενοποιήθηκαν. Την αρχική ημέρα της καλλιέργειας τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα επέφεραν ελάχιστη κυτταρική λύση ($\leq 10\%$). Οι μικρές συγκεντρώσεις του VEGF δεν μείωσαν την κυτταροτοξικότητα των T κυττάρων στις ημέρες 7 και 14. Ενώ οι συγκεντρώσεις του VEGF $\geq 1 \text{ngml}^{-1}$ επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των T κυττάρων το οποίο ήταν εμφανές σε όλες τις αναλογίες δραστικών προς κυττάρων στόχων που εξετάστηκαν. (ΕΙΚΟΝΑ 18). Ειδικότερα, στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταροτοξικότητας των T κυττάρων παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις του

VEGF από 1-100ngml⁻¹ απέναντι σε κύτταρα στόχους μιας K562 κυτταρικής σειράς και μιας κυτταρικής σειράς Daudi (Σε όλες τις περιπτώσεις P=0.012) και στις συγκεντρώσεις του VEGF από 5-100ngml⁻¹ απέναντι σε κύτταρα στόχους, αυτόλογα καρκινικά κύτταρα.(P=0.018) Η μείωση της λύσης των κυττάρων στόχων ήταν περισσότερο εμφανής την ημέρα 14, κάτι που δείχνει πως τόσο η συγκέντρωση του VEGF όσο και η παρατεταμένη παρουσία του συμβάλλουν στην καταστολή της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των T κυττάρων. Η κυτταροτοξικότητα απέναντι στα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα ήταν μικρότερη απ' αυτή απέναντι στους άλλους δυο στόχους (P=0.012) τόσο για τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με ή και χωρίς την παρουσία του VEGF.



ΕΙΚΟΝΑ 18. Ο VEGF καταστέλλει την κυτταροτοξικότητα των T κυττάρων. Λεμφοκύτταρα από ασκίτη ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (n=5) επώαστηκαν με αντι-CD-3 και IL-2 για 14 ημέρες με την παρουσία του VEGF (5 ng/ml) ή μη. Εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητα τους απέναντι σε κύτταρα στόχους K562 , Daudi και αυτόλογα καρκινικά κύτταρα σε ποικίλες αναλογίες δραστικών κυττάρων προς κύτταρα στόχους. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές σε εκατοστιαία κλίμακα ±SD. *P<0.05 για σύγκριση της κυτταροτοξικότητας ανάμεσα στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με την παρουσία VEGF σε σχέση με το control. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ενοποιημένα δεδομένα από όλες τις αναλογίες αναλογίες δραστικών κυττάρων προς κύτταρα στόχους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανοσολογική λειτουργία είναι μειωμένη στους καρκινοπαθείς και οι όγκοι αποφεύγουν αποτελεσματικά την ανοσολογική αναγνώριση και εξάλειψη μέσω αρκετών μεθόδων μηχανισμών απόδρασης. Ένας κύριος μηχανισμός για την διαφυγή του όγκου είναι η μεταβολή των T κυττάρων, η οποία προκαλείται από τον όγκο. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα T κύτταρα στους καρκινοπαθείς ασθενείς υπόκεινται σε φαινοτυπικές και λειτουργικές μεταβολές, προωθώντας την διαφυγή του όγκου από την ανοσολογική επιτήρηση. Ένας από τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνος για αυτές τις αλλαγές είναι η παραγωγή αρκετών παραγόντων από τα κύτταρα του όγκου, οι οποίοι δρουν άμεσα (για παράδειγμα TGF-β) ή έμμεσα μέσω κυττάρων που επιδρούν στα T κύτταρα (για παράδειγμα τα T-ρυθμιστικά κύτταρα) ή έμμεσα στα T κύτταρα ή/και στα μονοκύτταρα (148). Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου παράγεται σε αφθονία από την πλειονότητα των στερεών όγκων και εκτός από το να προωθεί την νεοαγγειογένεση, έχειδειχθεί ότι επηρεάζει την λειτουργική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, ένα στοιχείο κλειδί για το ανοσολογικό σύστημα, υπεύθυνο για την παρουσίαση των αντιγόνων και ενεργοποίηση των T κυττάρων (119).

Σε προηγούμενες μελέτες της Θεραπευτικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, έχειδειχθεί ότι σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών, τα επίπεδα του VEGF στον ασκίτη σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με συγκεκριμένους υποπληθυσμούς των T κυττάρων που είναι ουσιώδεις για να εξαπολυθεί η απάντηση εναντίον του όγκου (144). Λαμβάνοντας υπ' όψιν την σχετικά υψηλή συγκέντρωση των επιπέδων του VEGF στο ασκίτικο υγρό των ασθενών αυτών, κάναμε την υπόθεση ότι ο VEGF ασκεί την ανασταλτική του δράση άμεσα στα T κύτταρα μέσω των υποδοχέων του VEGF που εκφράζονται στην επιφάνεια τους, προκαλώντας την καταστολή του πολλαπλασιασμού τους, διαδραματίζοντας μ' αυτόν τον τρόπο ένα σημαντικό ρόλο στην διαφυγή του όγκου απ' το ανοσοποιητικό σύστημα.

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει μια σημαντική κατασταλτική δράση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου στον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων, προερχόμενα από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος τόσο από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών. Επίσης, σε γνώση μας, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει μια σημαντική κατασταλτική δράση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου στον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων, προερχόμενα από λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από ασκτικό υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Αυτή η επίδραση είναι όμοια τόσο στα κύτταρα ασθενών όσο και υγιών είτε προέρχονται από περιφερικό αίμα είτε από ασκτικό υγρό και εξαρτάται από την δόση του VEGF και την διάρκεια της καλλιέργειας ενώ εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις του VEGF που συχνότερα συναντώνται στον ασκίτη παρά στον ορό περιφερικού αίματος κατά την κλινική πρακτική. Αυτό το φαινόμενο δεν περιορίστηκε σε ένα συγκεκριμένο υποπληθυσμό των Τ κυττάρων. Θα πρέπει να επισημανθεί πως το μικρό ποσοστό των ανοσολογικά σημαντικών πληθυσμών, όπως τα Tregs ή τα CD3+CD56+ κύτταρα, ίσως απέτρεψε την ανίχνευση μικρών αλλαγών στους υποπληθυσμούς αυτούς, στα πειράματά μας.

Βρήκαμε πως το κεκαθαρμένο αντισώμα αντι-CD3 και η ιντερλευκίνη IL-2 διεγείρουν την έκφραση του VEGFR-2 στην επιφάνεια των Τ κυττάρων. Σε προηγούμενες μελέτες, έχει αναφερθεί η έκφραση του mRNA των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 σε κυτταρικές σειρές Τ κυττάρων ανθρώπου και ποντικού (149, 150), αλλά η έκφραση του VEGFR-2 σε κύτταρα από την περιφερική κυκλοφορία ανθρώπου δεν έχει ποτέ καταδειχθεί με κυτταρομετρία ροής, ανοσοϊστοχημεία και την ανάλυση Western Blott. Ο κ.Suzuki και οι συνεργάτες του πρόσφατα απέδειξαν ότι ο VEGF εκφράζεται από τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα CD25⁺ FOXP3⁺ CD4⁺ (Tregs) (151). Σε μια πρόσφατη μελέτη, ο κ. Basu και οι συνεργάτες του, ανέφεραν ότι δεν υπάρχει έκφραση των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 σε μη ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ενώ μετά την ενεργοποίησή τους εκφράζουν τόσο τον VEGFR-1 όσο και τον VEGFR-2 (152). Αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά πρωτόκολλα ενεργοποίησης των Τ κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν από τον κ. Basu και τους συνεργάτες του και την δική μας (24hr με 1μg/ml αντι-CD3 έναντι 7-14 ημέρες με 25ng/ml αντι-CD3 και IL-2 αντίστοιχα). Σημαντικότερα, αν και ο κ. Basu και οι συνεργάτες του μελέτησαν την έκφραση των υποδοχέων του VEGF σε αντιγονο-εμπειρικής μνήμης Τ κύτταρα

(CD4⁺ CD45RO⁺) η πιθανότητα ενός διαφορετικού τρόπου έκφρασης των υποδοχέων του VEGF ανάμεσα σε επιλεγμένους υποπληθυσμούς των T κυττάρων σχετιζόμενο με επακόλουθη κυτταρική ενεργοποίηση ή καταστολή μέσω της πλειοτροπικής δράσης κυτοκινών όπως ο VEGF, πρέπει να διευκρινιστεί. Τα δεδομένα μας, είναι ενδεικτικά της έκφρασης του VEGFR-2 από περισσότερους υποτύπους των T κυττάρων από τα Tregs και τα T κύτταρα μνήμης μετά την ενεργοποίησή τους. Μια και μια τέτοια έκφραση του VEGFR-2 βρέθηκε στην πλειονότητα των κυττάρων που τοποθετήσαμε σε κυτταροκαλλιέργειες, ενώ τα Tregs και τα T κύτταρα μνήμης αποτελούν μόνο ένα ποσοστό του συνολικού πληθυσμού των T κυττάρων και δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αύξηση στην έκφραση του VEGFR-2 σε κάποιον συγκεκριμένο υποπληθυσμό κυττάρων που μελετήθηκαν (CD4+, CD8+, Tregs). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με το γεγονός ότι ο VEGFR-1 συνήθως δεν μεταδίδει σήματα ενδοκυτταρικά αλλά πρόκειται για έναν υποδοχέα που δρα ως μέσο παραπλάνησης και οι κύριες δράσεις του VEGF εκτελούνται μέσω της σύνδεσης του στον VEGFR-2.

Επίσης, ανακαλύψαμε ότι η κατασταλτική δράση του VEGF επιτυγχάνεται μέσω της άμεσης σύνδεσης του, στον υποδοχέα VEGFR-2. Αυτό το αποδείξαμε με την χρήση αντισωμάτων που αδρανοποιούν τον VEGFR-2 στις κυτταροκαλλιέργειες, η οποία οδήγησε στην πλήρη αποκατάσταση της καταστολής που προκαλεί ο VEGF.

Ο αυξητικός παράγων του αγγειακού ενδοθηλίου παρουσίασε και μια κατασταλτική δράση όσον αφορά την λειτουργικότητα των T λεμφοκυττάρων. Αυτή ήταν εμφανής απέναντι σε κύτταρα στόχους μιας K562, και μιας Daudi κυτταρικής σειράς για τα T λεμφοκύτταρα προερχόμενα από περιφερικό αίμα καθώς και απέναντι σε κύτταρα στόχους μιας K562, μιας Daudi κυτταρικής σειράς και αυτόλογα καρκινικά κύτταρα για τα T λεμφοκύτταρα προερχόμενα από ασκίτη. Η ελάχιστη συγκέντρωση του VEGF (1-5 ngm⁻¹) η οποία κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό και την λειτουργικότητα των T κυττάρων αντιστοιχεί στα επίπεδα του VEGF που μετρήθηκαν στο ασκίτικο υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (144). Η κλινική συσχέτιση των ευρημάτων αυτών ενδυναμώνεται περαιτέρω καθώς έχει ήδη δειχθεί από την Θεραπευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών ότι συγκεντρώσεις του VEGF > 1,9 ngm⁻¹ σχετίζονται αντίστροφα με την πρόγνωση (144).

Η ικανότητα των T κυττάρων που απομονώθηκαν από ασκитικό υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών να προκαλέσουν τη λύση αυτόλογων καρκινικών κυττάρων ήταν χαμηλή σε σχέση με εκείνη απέναντι σε K562 και Daudi κύτταρα και μειώθηκε περαιτέρω με την προσθήκη του VEGF. Αρκετοί λόγοι μπορούν να δικαιολογήσουν αυτή την παρατήρηση. Αρχικά στις καλλιέργειες μας, η παρουσία του αντι-CD-3 σε συνδυασμό με την IL-2 σε απουσία αντιγονικής διέγερσης, ευνοεί την μη ειδική διέγερση όλων των κυττάρων που φέρουν υποδοχείς T κυττάρων. Συνεπώς οι κλώνοι των αυτόλογων αντιγονοειδικών T κυττάρων του όγκου δεν πολλαπλασιάζονται κατά προτίμηση και μπορεί τελικά να αποτελούν ένα μικρό υποπληθυσμό ανάμεσα στα πολλαπλασιαζόμενα T κύτταρα (153). Δεύτερον, το περιβάλλον καταστολής του ασκίτη, είναι πιθανόν να εμποδίζει τη λειτουργικότητα ιδιαίτερα των αντιγονοειδικών T κυττάρων του όγκου κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την φτωχή ανάπτυξη τους εκτός του σώματος, *ex vivo* (154). Τέλος, έχει αναφερθεί συχνά πως τα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν την καταστροφή τους από τα T κύτταρα μέσω της καταστολής έκφρασης των αντιγονικών μορίων MHC και/ή των αντιγόνων του όγκου (155). Για αυτό το λόγο, το γεγονός ότι παρατηρήσαμε θανάτωση των αυτόλογων κυττάρων είναι σημαντικό από μόνο του. Αυτό ιδωμένο στο γενικό πλαίσιο των άλλων ευρημάτων μας, υποστηρίζει την υπόθεση πως τα T κύτταρα που διαμένουν σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε καρκινικά κύτταρα, αρχικά ενεργοποιούνται από αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο, αλλά η αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σε έκφραση του VEGFR-2 και τελικά σε καταστολή που επάγεται από τα αυξημένα επίπεδα VEGF που είναι παρόντα στο ασκитικό υγρό.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την παραγωγή του VEGF από κυτταρικές σειρές και κλώνους T κυττάρων ποντικού και ανθρώπου ως απάντηση στην υποξία και την εξομοίωση αντιγονικής παρουσίας (148, 156, 157). Ο κ. Freeman και οι συνεργάτες του, πρώτοι απέδειξαν την έκφραση του VEGF από μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος, αλλά εκτός από τα T κύτταρα, αυτοί οι πληθυσμοί περιλαμβάνουν αρκετούς ακόμη κυτταρικούς τύπους, όπως τα μονοκύτταρα, ικανά να εκκρίνουν VEGF στο υπερκείμενο των καλλιέργειών (150). Ο κ. Mor και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η έκφραση του VEGF υποκινείται από την ιντερλευκίνη IL-2 σε κυτταρική σειρά αρουραίου (149). Τα δεδομένα μας, αποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι το κεκαθαρισμένο αντισώμα αντι-CD3 και η ιντερλευκίνη IL-2, εκτός από την μιτογονική τους δράση διεγείρουν την έκκριση του αυξητικού παράγοντα

του αγγειακού ενδοθηλίου από T κύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου καθώς και από T κύτταρα προερχόμενα από ασκτικό υγρό ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών.

Αυτά τα ευρήματα ίσως να εμπλέκονται τόσο στη φυσιολογία όσο και στην παθοφυσιολογία της ανοσολογικής απάντησης εναντίον του όγκου, στη αγγειογένεση του όγκου και επομένως και στην διαφυγή του όγκου. Είναι γενικώς αποδεκτό πως μια δραστική απάντηση εναντίον του όγκου περιλαμβάνει αρχικά την αναγνώριση των αντιγόνων του όγκου από T κύτταρα (πραγματοποιείται κυρίως από τα δενδριτικά κύτταρα), την ακόλουθη ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω του υποδοχέα των T κυττάρων (αυτή η διαδικασία μπορεί να προσομοιωθεί με την επώαση και διέγερση των T κυττάρων με αντίσωμα αντι-CD3) και επίσης την απελευθέρωση ανοσοδιεγερτικών παραγόντων, όπως η ιντερλευκίνη IL-2, από ανοσολογικά κύτταρα, η οποία ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Όπως φαίνεται στη παρούσα μελέτη, αυτές οι ανοσολογικές διαδικασίες προκαλούν την σύνθεση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου. Αυτό το γεγονός, ίσως προτείνει ότι ο VEGF που προέρχεται από τα T κύτταρα μπορεί να προωθήσει την αγγειογένεση του όγκου ως αποτέλεσμα της παρακρινικής αλληλεπίδρασης του με το στρωματικό ιστό του όγκου. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων επιφέρει την έκφραση του VEGFR-2 στην επιφάνεια τους, κάνοντας τα μ' αυτόν τον τρόπο ευάλωτα στην καταστολή από τον VEGF. Μπορεί να θεωρηθεί ότι η παραγωγή του VEGF από τα T λεμφοκύτταρα ίσως αποβαίνει σε μια αυτοκρινή κατασταλτική επίδραση. Παρ' όλα αυτά, πιστεύουμε ότι ο ενδογενής VEGF δεν είναι η κύρια αιτία της καταστολής των T κυττάρων. Τα επίπεδα του VEGF που παρήχθησαν στις καλλιέργειες T κυττάρων προερχόμενα από ασκτικό υγρό ήταν υψηλότερα απ' αυτά που είχαμε βρει στις καλλιέργειες T κυττάρων από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (158). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την δοσο-εξαρτώμενη δράση του VEGF, δεικνύει πως η αυτοκρινής δράση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου είναι πιο εμφανής στο περιβάλλον του όγκου. Ωστόσο τα επίπεδα του VEGF που είναι απαραίτητα για να προκαλέσουν σημαντική καταστολή του πολλαπλασιασμού και της λειτουργικότητας των T κυττάρων, ήταν πολύ μεγαλύτερα από αυτά που παρήχθησαν από T κύτταρα. Αντιθέτως, τα επίπεδα του VEGF που προκαλούν καταστολή ήταν όμοια με αυτά που μετρήθηκαν στον ασκίτη των ασθενών τόσο από αυτή τη μελέτη όσο και από προηγούμενες τύπου cohort μελέτες ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών που πραγματοποιήθηκαν από

την Θεραπευτική Κλινική του ΕΚΠΑ (144). Για αυτό το λόγο πιστεύουμε ότι τουλάχιστον στον καρκίνο ωοθηκών, η καταστολή των T κυττάρων οφείλεται κυρίως στον VEGF που προέρχεται από τα κύτταρα του όγκου. Η αυτοκρινής δράση μπορεί να διαδραματίσει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μη ελεγχόμενης ενεργοποίησης των T κυττάρων σε αρκετές φυσιολογικές ή παθοφυσιολογικές συνθήκες, όπως η φλεγμονή ή η αυτοανοσία.

Συνοψίζοντας, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι T λεμφοκύτταρα από ασκитικό υγρό και περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και υγιών δοτριών εκκρίνουν τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου και εκφράζουν τον υποδοχέα VEGFR-2 στην επιφάνεια τους ως απάντηση στην ενεργοποίησή τους. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι η ενεργοποίηση των T κυττάρων από τον όγκο οδηγεί στην έκφραση του VEGFR-2, που με τη σειρά του επιφέρει την καταστολή των ενεργοποιημένων T κυττάρων από τον VEGF που παράγεται από τον όγκο, ούτως ώστε να λάβει χώρα μια ανοσοκατασταλτική δράση. Αυτά τα ευρήματα ίσως έχουν κλινική συσχέτιση, ειδικά μετά από πρόσφατες μελέτες που προτείνουν πως υπάρχει όφελος από την προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος αντι-VEGF, bevacizumab, στα πρωτόκολλα χημειοθεραπείας για την αντιμετώπιση του προχωρημένου καρκίνου ωοθηκών (131, 159). Η λογική είναι ότι οι θεραπείες που στρέφονται κατά του VEGF ή και του VEGFR-2 ίσως στοχεύουν όχι μόνο την αγγειογένεση αλλά επίσης και την διαφυγή του όγκου από την ανοσολογική επιτήρηση. Αν κάτι τέτοιο είναι αλήθεια, ο βαθμός επίδρασης του VEGF στο ανοσολογικό σύστημα ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιλεγθούν οι ασθενείς που πιθανόν να ωφεληθούν από τέτοιες προσεγγίσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών είναι η πρώτη αιτία θανάτου από γυναικολογικό καρκίνο και η τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο συνολικά στο γυναικείο πληθυσμό. Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν πως ο VEGF συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου όχι μόνο με το να προωθεί την αγγειογένεση αλλά επίσης μ' έναν έμμεσο μηχανισμό ρύθμισης των T κυττάρων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απάντηση απέναντι στον όγκο. Τα T-κύτταρα είναι ο κύριος παράγων στην έναρξη και πρόοδο της ανοσολογικής απάντησης απέναντι στον όγκο σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων και των καρκινωμάτων της ωοθήκης και οι καρκινοπαθείς ασθενείς εμφανίζουν εξασθενημένη ανοσολογική λειτουργία. Σε προηγούμενες μελέτες της Αιματολογικής-Ογκολογικής Μονάδος της Θεραπευτικής Κλινικής έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα του VEGF στο ασκитικό υγρό ήταν ένας ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας σε μια μελέτη τύπου cohort, 65 ασθενών με προχωρημένο επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών και δείχθηκε πως συσχετιζόνταν αντίστροφα με ορισμένους κυτταροτοξικούς υποπληθυσμούς όπως τα $CD3^+CD56^+$ NK-like T κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά της επιπρόσθετης ανοσοκατασταλτικής λειτουργίας αυτού του παράγοντα. Ωστόσο, η πιθανή άμεση επίδραση του VEGF στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων καθώς και ο τρόπος που αυτή συμβαίνει δεν έχει διερευνηθεί.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η επίδραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων ασθενών με καρκίνο ωοθηκών.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τις ανάγκες της μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα ασκитικής συλλογής από πάνω από 25 γυναίκες που χειρουργήθηκαν στην Α' Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα με ιστολογικά επιβεβαιωμένο επιθηλιακό

καρκίνο των ωοθηκών καθώς και τα αντίστοιχα δείγματα αίματος των ασθενών αυτών από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 15 ασθενείς κατά την δημοσίευση των αποτελεσμάτων . Επίσης, έχουν ληφθεί και 10 δείγματα αίματος από υγιείς γυναίκες δότριες. . Όλες οι ασθενείς έχουν ενυπόγραφα συγκατατεθεί για την λήψη βιολογικού υλικού. Αφού απομονώθηκαν τα λεμφοκύτταρα από τα δείγματα βιολογικών υγρών αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες για 14 ημέρες με την προσθήκη ή μη του VEGF και μετρήθηκε ο αριθμός τους. Τα κύτταρα ελέχθησαν ως προς την έκφραση των υποδοχέων του VEGF με κυτταρομετρία ροής ανοσοϊστοχημεία και Western Blot, ως προς την κυτταροτοξικότητα τους με δοκιμασία απελευθέρωσης ^{51}Cr και ως προς την έκκριση VEGF με ELISA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λόγω του μεγέθους της μελέτης καθώς και της κλινικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων αποφασίστηκε η ξεχωριστή δημοσίευση των αποτελεσμάτων αρχικά όσον αφορά την επίδραση του VEGF σε λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το αίμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και υγιών δοτριών και αργότερα όσον αφορά την επίδραση του VEGF σε λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το ασκτικό υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών.

Τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών δημοσιεύθηκαν το Φεβρουάριο του 2012 στο περιοδικό *International Journal of Cancer*. Εν συντομία, δείχθηκε πως η προσθήκη του VEGF στις καλλιέργειες των T κυττάρων περιφερικού αίματος μειώνει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Αυτή η καταστολή εξαρτάται από την δόση του VEGF όσο και από την χρονική διάρκεια της καλλιέργειας. Ωστόσο είναι όμοια τόσο στα δείγματα από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών όσο και από φυσιολογικές δότριες. Τα CD3⁺ T κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους εκφράζουν τον VEGFR-2 κάτι που επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής, ανοσοϊστοχημεία και Western Blot ανάλυση. Ενώ η κατασταλτική δράση του VEGF στα T κύτταρα ασκείται άμεσα μέσω του VEGFR-2 καθώς η προσθήκη του αντιγόνου αδρανοποίησης anti-VEGFR-2 ανέστειλε την δράση αυτή τόσο στα δείγματα από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών όσο και από φυσιολογικές δότριες. Επίσης, δείχθηκε πως ο VEGF μειώνει την

κυτταροτοξική δραστηριότητα των T κυττάρων απέναντι σε κύτταρα στόχους από μια K562 κυτταρική σειρά και από μια κυτταρική σειρά Daudi καθώς και ότι τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκκρίνουν VEGF στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Συνοψίζοντας η μελέτη απέδειξε πως τα T κύτταρα εκκρίνουν VEGF και εκφράζουν τον VEGFR-2 μετά την ενεργοποίησή τους και ο VEGF καταστέλλει την ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω του VEGFR-2.

Αυτή η δημοσίευση πιστεύουμε πως παρείχε στην επιστημονική κοινότητα χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά τους μηχανισμούς καταστολής των T κυττάρων σ' ένα περιβάλλον υπερβολικής παραγωγής αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου όπως σε συνθήκες ανάπτυξης κακοήθειας. Δείξαμε πως η καταστολή ασκείται μέσω της έκφραση του VEGFR-2 στην κυτταρική επιφάνεια των T κυττάρων. Συνεπώς, ο VEGF εκτός από ένας σημαντικός παράγοντας για την αγγειογένεση φαίνεται να έχει κατασταλτική δράση στα T-κύτταρα και πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εμπλέκονται στην καταπολέμηση του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι η παραγωγή μικρής ποσότητας του VEGF από τα T κύτταρα, συμβάλει στην τοπική αγγειογένεση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Αυτά τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την πολλαπλή δράση του VEGF στην καρκινογένεση και στην πρόοδο της νόσου και ενδυναμώνει τον προγνωστικό του ρόλο στον καρκίνο των ωθηκών. Ενώ υπάρχει και κλινική συσχέτιση μετά από από πρόσφατες αναφορές που προτείνουν πως υπάρχει όφελος από την προσθήκη ενός μονοκλωνικού αντισώματος anti-VEGF στα πρωτόκολλα χημειοθεραπείας σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ωθηκών.

Τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων από δείγματα ασκτικού υγρού ασθενών με καρκίνο ωθηκών δημοσιεύθηκαν το Νοέμβριο του 2012 στο περιοδικό *British Journal of Cancer*. Εν συντομία, δείχθηκε πως η προσθήκη του VEGF στις καλλιέργειες των T κυττάρων που απομονώθηκαν από ασκτικό υγρό ασθενών με καρκίνο ωθηκών μειώνει σημαντικά τον αριθμό και τον βαθμό πολλαπλασιασμού των T κυττάρων. Αυτή η καταστολή εξαρτάται από την δόση του VEGF όσο και από την χρονική διάρκεια της καλλιέργειας. Τα CD3⁺ T κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους εκφράζουν τον VEGFR-2 κάτι που επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής, ανοσοϊστοχημεία και Western Blot ανάλυση. Ενώ η κατασταλτική δράση του VEGF στα T κύτταρα ασκείται άμεσα μέσω του

VEGFR-2 καθώς η προσθήκη του ειδικού αντιγόνου αδρανοποίησης anti-VEGFR-2 ανέστειλε την δράση αυτή. Επίσης, δείχθηκε πως ο VEGF μειώνει την κυτταροτοξική δραστηριότητα των T κυττάρων απέναντι σε κύτταρα στόχους από μια K562 κυτταρική σειρά από μια κυτταρική σειρά Daudi καθώς και απέναντι σε αυτόλογα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από το ασκτικό υγρό των ασθενών αυτών. Επίσης δείχθηκε πως τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκκρίνουν VEGF στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Συνοψίζοντας η μελέτη απέδειξε πως τα T κύτταρα που πρόερχονται από ασκίτη ασθενών με καρκίνο ωοθηκών εκκρίνουν VEGF και εκφράζουν τον VEGFR-2 μετά την ενεργοποίησή τους. Ο VEGF καταστέλλει την ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω του VEGFR-2.

Αυτή η δημοσίευση επιβεβαίωσε τα ευρήματα της προηγούμενης ενώ παρέιχε στην επιστημονική κοινότητα χρήσιμες νέες πληροφορίες όσον αφορά τους μηχανισμούς καταστολής των T κυττάρων καθώς μελετήθηκαν κύτταρα προερχόμενα από ένα περιβάλλον υπερβολικής παραγωγής VEGF όπως το ασκτικό υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Είναι χαρακτηριστικό πως τα επίπεδα του VEGF που είναι απαραίτητα για να προκαλέσουν σημαντική καταστολή του πολλαπλασιασμού και της λειτουργικότητας των T κυττάρων ήταν όμοια με αυτά που μετρήθηκαν στον ασκίτη των ασθενών τόσο από αυτή τη μελέτη όσο και από προηγούμενες τύπου cohort μελέτες ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών που πραγματοποιήθηκαν από την Θεραπευτική Κλινική του ΕΚΠΑ. Είναι επίσης σημαντικό να τονιστεί, ότι η δράση των T κυττάρων απέναντι στα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα καθώς και η επίδραση του VEGF σ' αυτή είναι το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μελέτης σε σχέση με τη προηγούμενη δημοσίευση της έρευνας μας. Συνοψίζοντας, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι T λεμφοκύτταρα από ασκτικό υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών εκκρίνουν VEGF και εκφράζουν τον υποδοχέα VEGFR-2 στην επιφάνειά τους ως απάντηση στην ενεργοποίησή τους. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι η ενεργοποίηση των T κυττάρων από τον όγκο οδηγεί στην έκφραση του VEGFR-2, που με τη σειρά του επιφέρει την καταστολή των ενεργοποιημένων T κυττάρων από τον VEGF που παράγεται από τον όγκο, ούτως ώστε να λάβει χώρα μια ανοσοκατασταλτική δράση. Αυτά τα ευρήματα ίσως έχουν κλινική συσχέτιση, ειδικά μετά από πρόσφατες μελέτες που προτείνουν πως υπάρχει όφελος από την προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος anti-VEGF, bevacizumab, στα πρωτόκολλα χημειοθεραπείας για την αντιμετώπιση του

προχωρημένου καρκίνου ωθηκών. Η λογική είναι ότι οι θεραπείες που στρέφονται κατά του VEGF ή και του VEGFR-2 ίσως στοχεύουν όχι μόνο την αγγειογένεση αλλά επίσης και την διαφυγή του όγκου από την ανοσολογική επιτήρηση. Αν κάτι τέτοιο είναι αλήθεια, ο βαθμός επίδρασης του VEGF στο ανοσολογικό σύστημα ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιλεγθούν οι ασθενείς που πιθανόν να ωφεληθούν από τέτοιες προσεγγίσεις.

SUMMARY

INTRODUCTION

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the leading cause of death among gynecological malignancies and the fourth most common cause of cancer-related deaths among women. Recent data suggest that VEGF contributes to tumor growth not only by promoting angiogenesis but also by an indirect mechanism of regulation of T cells involved in the immune response against the tumor. T cells are pivotal in the induction and progression of the anti-tumor immune reaction in many types of cancer, including ovarian carcinomas and cancer patients demonstrate impaired T-cell functions. In previous studies of the Department of Clinical Therapeutics of university of Athens, has been demonstrated that the levels of VEGF in the ascitic fluid was an independent adverse prognostic factor in a cohort of 65 patients with advanced ovarian cancer and were inversely correlated with immunologically important T-cell subpopulations, such as CD3⁺CD56⁺ NK-like T cells. These results were indicative of an additional immunosuppressive function exerted by this factor. Nevertheless, the direct effect of VEGF on T cells as well as the mechanisms underlying such actions has not been studied yet.

AIM

The aim of the present thesis is to study the possible direct effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on T cells subpopulations of ovarian cancer patients.

MATERIALS AND METHODS

Ascitic fluids and peripheral blood samples were collected in heparinized tubes from over 25 patients who had undergone surgery in the A Department of Obstetrics and Gynecology of university of Athens and their histological exam reported epithelial

ovarian cancer. In the publication of the study were included samples from 15 ovarian cancer patients and peripheral blood samples from 10 healthy donors. The study protocol had appropriate IRB approval and all subjects gave their informed consent for the collection of the samples. T cells isolated from the biological samples were expanded in cultures for 14 days, with or without VEGF and the number of viable T cells were counted. The expression of VEGF receptors was assayed by flow cytometry, immunocytochemistry and Western blotting. Cultured T cells were also tested for their cytotoxic activity in a standard 4-hr ^{51}Cr -release assay, and to assess the ability of activated T cells to secrete VEGF, levels in culture supernatants were measured by enzyme linked immunosorbent assay.

RESULTS-DISCUSSION

Due to the size of the study and the clinical significance of the results it was decided to separate the publication of the results. The first publication regards to the effect of VEGF on lymphocytes isolated from the peripheral blood of patients with ovarian cancer and healthy donors and the second one regards to the effect of VEGF on lymphocytes isolated from ascetic fluid of patients with ovarian cancer.

The results regarding the effect of vascular endothelial growth factor on lymphocytes isolated from peripheral blood of ovarian cancer patients and healthy donors were published in February 2012 in *International Journal of Cancer*. Briefly, we demonstrated a significant inhibitory effect of VEGF on the proliferation of T cells derived from peripheral blood lymphocytes. This effect was time- and dose-dependent and was similar among the cancer patient and healthy donor-derived cell cultures. CD3^+ T cells expressed VEGFR-2 on their surface upon activation. This was confirmed by flow cytometry, immunocytochemistry and western blotting analysis. We also showed that VEGF suppresses T cell proliferation through VEGFR-2, as the addition of anti-VEGFR-2 mAb fully restored the VEGF-induced suppression of T cell proliferation both in cancer patient and healthy donor-derived cell cultures. Furthermore, we showed that VEGF significantly reduced the cytotoxic activity of T cells against K562 and Daudi-target cells. Moreover, we demonstrated that activated T cells have the ability to secrete VEGF in their culture environment. Overall, this

study showed that T cells secrete VEGF and express VEGFR-2 upon activation and VEGF directly suppresses T cell activation via VEGF receptor type 2.

We believe that this publication provided the research community with the insight of a mechanism of T cell suppression in the context of excessive production of VEGF, such as malignant conditions. We show that this suppression is mediated through the expression of VEGFR-2 on T cell surface. The translational consequence of the above is that VEGF may be a marker not only for angiogenesis but it may also play a direct suppressive role on T cells and more specifically on cells of the immune system that are involved in fighting cancer. The production of low amounts of VEGF by T cells may contribute to local angiogenesis under physiological conditions. These results underline the pleiotropic actions of VEGF in carcinogenesis and cancer progression and strengthen its prognostic importance in ovarian cancer. They are clinically relevant particularly after recent reports suggesting a benefit by the addition of an anti-VEGF monoclonal antibody to chemotherapy for advanced ovarian cancer.

The results regarding the effect of vascular endothelial growth factor on lymphocytes isolated from ascites of ovarian cancer patients were published in November 2012 in *British Journal of Cancer*. Briefly, we demonstrated that the addition of VEGF in cultures significantly reduced the number and proliferation rate of T cells. This effect was time- and dose-dependent. CD3⁺ T cells expressed VEGFR-2 on their surface upon activation. This was confirmed by flow cytometry, immunocytochemistry and western blotting analysis. We also showed that VEGF suppresses T cell proliferation through VEGFR-2, as the addition of anti-VEGFR-2 mAb fully restored the VEGF-induced suppression of T cell proliferation. Furthermore, we showed that VEGF significantly reduced the cytotoxic activity of T cells against K562 and Daudi-target cells and against autologous cancer cells isolated from the ascitic fluid of the cancer patients. Moreover, we demonstrated that activated T cells have the ability to secrete VEGF in their culture environment. In summary, this study showed that T cells isolated from the ascites of ovarian cancer patients secrete VEGF and express VEGFR-2 upon activation and VEGF directly suppresses T cell activation via VEGF receptor type 2.

This publication confirmed the findings of the previous one and provided the research community with new knowledge of a mechanism of T cell suppression in the context of excessive production of VEGF, such as ascitic fluid of ovarian cancer patients. There is importance to mention that suppressive VEGF levels were similar to

those measured in the ascites in this study as well as in a previous larger cohort of advanced ovarian cancer patients of Department of Clinical Therapeutics. It is also of importance to stress here, that the action of T cells against autologous cancer cells is a major feature of this study compared with our previous publication. In summary, we have demonstrated for the first time that T lymphocytes derived from ovarian cancer patients' ascites secrete VEGF and express VEGFR-2 on their surface in response to their activation. This in turn, promotes the suppression of activated T cells by the VEGF produced by the tumour, thus suggesting an immunosuppressive effect. These findings may have clinical relevance, particularly after recent results suggesting a benefit by the addition of the anti-VEGF monoclonal antibody, bevacizumab, to chemotherapy for advanced ovarian cancer. The rationale is that anti-VEGF and/or VEGFR-2 therapies may target not only angiogenesis but also tumor escape from immune surveillance. If this is true, the degree of the effect of VEGF on the immune system may be used to select patients likely to benefit from such approaches.

PUBLICATIONS

Int J Cancer. 2012 Feb 15;130(4):857-64. doi: 10.1002/ijc.26094. Epub 2011 May 25.

VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2.

Ziogas AC, Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, Politi E, Terpos E, Rodolakis A, Vlahos G, Thomakos N, Haidopoulos D, Antsaklis A, Dimopoulos MA, Bamias A.

The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor angiogenesis is well characterized; nevertheless, it is also a key element in promoting tumor evasion of the immune system by downregulating dendritic cell maturation and thus T cell activation. We sought to investigate the possible direct effect of VEGF on T cell activation and through which type of VEGF receptor (VEGFR) it exerts this effect. Circulating T cells from healthy donors and ovarian cancer patients were expanded in cultures with anti-CD3 and IL-2 with or without VEGF for 14 days, and the number of T cells was assessed. Cultured T cells were also tested for their cytotoxic activity in a standard 4-hr (⁵¹Cr)-release assay, and the expression of VEGFRs 1, 2 and 3 was assayed by flow cytometry, immunocytochemistry and Western blotting. To assess the ability of activated T cells to secrete VEGF, levels in culture supernatants were measured by enzyme linked immunosorbent assay. The addition of VEGF in cultures significantly reduced T cell proliferation in a dose-dependent manner. Protein expression studies demonstrated that CD3(+) T cells express VEGFR-2 on their surface upon activation. Experiments with anti-VEGFR-2 antibodies showed that the direct suppressive effect of VEGF on T cell proliferation is mediated by VEGFR-2. We also showed that VEGF significantly reduced the cytotoxic activity of T cells and that activated T cells secrete VEGF in the culture environment. Overall, our study shows that T cells secrete VEGF and expresses VEGFR-2 upon activation. VEGF directly suppresses T cell activation via VEGF receptor type 2.

Br J Cancer. 2012 Nov 20;107(11):1869-75. doi: 10.1038/bjc.2012.468.

VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2.

Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, Politi E, Ioannou K, **Ziogas AC**, Rodolakis A, Vlahos G, Thomakos N, Haidopoulos D, Terpos E, Antsaklis A, Dimopoulos MA, Bamias A.

BACKGROUND:

Vascular endothelial growth factor action in tumour angiogenesis is well characterised; nevertheless, it functions as a key element in the promotion of the immune system's evasion by tumours. We sought to investigate the possible direct effect of VEGF on T-cell activation and through which type of VEGF receptor it exerts this effect on cells isolated from ovarian cancer patients' ascites.

METHODS:

T cells isolated from the ascites of ovarian cancer patients were cultured with anti-CD3 and IL-2, with or without VEGF for 14 days and the number of viable T cells was counted. Cytotoxic activity of cultured T cells and expression of VEGF receptor-2 (VEGFR-2), was assayed.

RESULTS:

The addition of VEGF in cultures significantly reduced the number and proliferation rate of T cells in a dose-dependent manner and CD3(+) T cells expressed VEGFR-2 on their surface upon activation. Experiments with specific anti-VEGFR-2 antibodies revealed that the direct suppressive effect of VEGF on T-cell proliferation is mediated by VEGFR-2. We also showed that VEGF significantly reduced the cytotoxic activity of T cells.

CONCLUSION:

Our study showed that ascites-derived T cells secrete VEGF and express VEGFR-2 upon activation. Vascular endothelial growth factor directly suppresses T-cell activation via VEGFR-2.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. O'Rahilly. Εμβρυολογία & Τερατολογία του Ανθρώπου. Αθήνα, 2000.
2. Langman. Medical Embryology. 2010.
3. Κρεατσάς ΓΚ. «Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική». 1998.
4. Novak. «Γυναικολογία». 2002.
5. Sobotta. Άτλας Ανατομικής του Ανθρώπου. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΣ
6. Quirk JT, Natarajan N. Ovarian cancer incidence in the United States, 1992-1999. *Gynecol Oncol* 2005;97:519-23.
7. Piek JM, van Diest PJ, Verheijen RH. Ovarian carcinogenesis: an alternative hypothesis. *Adv Exp Med Biol* 2008;622:79-87.
8. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
9. Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F, et al. Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Clin Cancer Res* 2004;10:2473-81.
10. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83 Suppl 1:135-66.
11. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, et al. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* 2000;89:2068-75.
12. Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG* 2005;112:857-65.
13. Chobanian N, Dietrich CS, 3rd. Ovarian cancer. *Surg Clin North Am* 2008;88:285-99, vi.
14. Kosary CL. SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: US SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics. 2007.
15. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2:163.

16. Riman T, Nilsson S, Persson IR. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:783-95.
17. Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, et al. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2003;104:228-32.
18. Havrilesky L, Darcy k M, Hamdan H, et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2003;21:3814-25.
19. Aunoble B, Sanches R, Didier E, et al. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol* 2000;16:567-76.
20. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;19:3-10.
21. Gadducci A, Cosio S, Tana R, et al. Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;69:12-27.
22. Cho KR, Shih Ie M. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:287-313.
23. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;164:1511-8.
24. Kurman RJ, Shih Ie M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*;34:433-43.
25. Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006;20:207-25.
26. Rossing MA, Tang MT, Flagg EW, et al. A case-control study of ovarian cancer in relation to infertility and the use of ovulation-inducing drugs. *Am J Epidemiol* 2004;160:1070-8.
27. Hinkula M, Pukkala E, Kyyronen P, et al. Incidence of ovarian cancer of grand multiparous women--a population-based study in Finland. *Gynecol Oncol* 2006;103:207-11.
28. Rostgaard K, Wohlfahrt J, Andersen PK, et al. Does pregnancy induce the shedding of premalignant ovarian cells? *Epidemiology* 2003;14:168-73.
29. Yen ML, Yen BL, Bai CH, et al. Risk factors for ovarian cancer in Taiwan: a case-control study in a low-incidence population. *Gynecol Oncol* 2003;89:318-24.

30. Riman T, Dickman PW, Nilsson S, et al. Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer: results from a Swedish case-control study. *Am J Epidemiol* 2002;156:363-73.
31. Lacey JV, Jr., Brinton LA, Leitzmann MF, et al. Menopausal hormone therapy and ovarian cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study Cohort. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1397-405.
32. Goodman MT, Howe HL, Tung KH, et al. Incidence of ovarian cancer by race and ethnicity in the United States, 1992-1997. *Cancer* 2003;97:2676-85.
33. Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA, et al. Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study. *JAMA* 1993;270:2813-8.
34. Ness RB, Grisso JA, Cottreau C, et al. Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. *Epidemiology* 2000;11:111-7.
35. Kiani F, Knutsen S, Singh P, et al. Dietary risk factors for ovarian cancer: the Adventist Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 2006;17:137-46.
36. Zhang M, Lee AH, Binns CW. Reproductive and dietary risk factors for epithelial ovarian cancer in China. *Gynecol Oncol* 2004;92:320-6.
37. Institute NC. 2007.
38. Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1416-26.
39. Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000;408:429-32.
40. Chen S, Iversen ES, Friebel T, et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *J Clin Oncol* 2006;24:863-71.
41. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1694-706.
42. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, et al. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 2003;36:9-17.
43. Gore H. Histopathology of ovarian cancer. *Semin Surg Oncol* 1994;10:255-60.
44. Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2003;27:985-93.

45. Storey DJ, Rush R, Stewart M, et al. Endometrioid epithelial ovarian cancer : 20 years of prospectively collected data from a single center. *Cancer* 2008;112:2211-20.
46. Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, et al. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 2000;88:2584-9.
47. GCF. Consensus Statement Released on Ovarian Cancer Symptoms. 2007.
48. Eitan R, Levine DA, Abu-Rustum N, et al. The clinical significance of malignant pleural effusions in patients with optimally debulked ovarian carcinoma. *Cancer* 2005;103:1397-401.
49. Clarke-Pearson DL. Clinical practice. Screening for ovarian cancer. *N Engl J Med* 2009;361:170-7.
50. Reynolds EA, Moller KA. A review and an update on the screening of epithelial ovarian cancer. *Curr Probl Cancer* 2006;30:203-32.
51. Guppy AE, Rustin GJ. CA125 response: can it replace the traditional response criteria in ovarian cancer? *Oncologist* 2002;7:437-43.
52. ACOG Committee Opinion: number 280, December 2002. The role of the generalist obstetrician-gynecologist in the early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2002;100:1413-6.
53. Buller RE, Vasilev S, DiSaia PJ. CA 125 kinetics: a cost-effective clinical tool to evaluate clinical trial outcomes in the 1990s. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1241-53; discussion 53-4.
54. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983;309:883-7.
55. Schorge JO. Epithelial Ovarian Cancer. In: John O. Schorge JIS, Lisa M. Halvorson, Barbara L. Hoffman, Karen D. Bradshaw, F. Gary Cunningham, ed. *Williams Gynecology: The McGraw-Hill Companies* 2008.
56. Lee KR TF, Prat J, et al. Tumours of the ovary and peritoneum [Surface epithelial-stromal tumours] In: WHO, ed. *World Health Organization Classification of Tumours*. Geneva, , 2003:117.
57. DeCherney AH. Pemalignant & Malignant Disorders of the ovary & oviducts. In: Alan H. DeCherney LN, T. Murphy Goodwin, Neri Laufer, ed. *Current*

Diagnosis & Treatment Obstetrics and Gynecology: The McGraw-Hill Companies, 2007.

58. Eisenhauer EL, Abu-Rustum NR, Sonoda Y, et al. The effect of maximal surgical cytoreduction on sensitivity to platinum-taxane chemotherapy and subsequent survival in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;108:276-81.
59. Rose PG, Nerenstone S, Brady MF, et al. Secondary surgical cytoreduction for advanced ovarian carcinoma. *N Engl J Med* 2004;351:2489-97.
60. Everett EN, French AE, Stone RL, et al. Initial chemotherapy followed by surgical cytoreduction for the treatment of stage III/IV epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:568-74; discussion 74-6.
61. van der Burg ME, van Lent M, Buyse M, et al. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med* 1995;332:629-34.
62. Chan JK, Tian C, Monk BJ, et al. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 2008;112:2202-10.
63. Ahmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP, et al. Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1996;14:2968-75.
64. Le T, Krepart GV, Lotocki RJ, et al. Clinically apparent early stage invasive epithelial ovarian carcinoma: should all be treated similarly? *Gynecol Oncol* 1999;74:252-4.
65. Vergote I, Amant F. Time to include high-risk early ovarian cancer in randomized phase III trials of advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;102:415-7.
66. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:699-708.
67. Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, et al. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1682-91.

68. Aravantinos G, Fountzilas G, Bamias A, et al. Carboplatin and paclitaxel versus cisplatin, paclitaxel and doxorubicin for first-line chemotherapy of advanced ovarian cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Eur J Cancer* 2008;44:2169-77.
69. Bell J, Brady MF, Young RC, et al. Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2006;102:432-9.
70. Markman M. Re: "Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study". *Gynecol Oncol* 2007;105:279-80; author reply 80-1.
71. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: an overview of randomised clinical trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. *BMJ* 1991;303:884-93.
72. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003;21:3194-200.
73. du Bois A, Weber B, Rochon J, et al. Addition of epirubicin as a third drug to carboplatin-paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a prospectively randomized gynecologic cancer intergroup trial by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group and the Groupe d'Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers Ovariens. *J Clin Oncol* 2006;24:1127-35.
74. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354:34-43.
75. Hess LM, Benham-Hutchins M, Herzog TJ, et al. A meta-analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front-line treatment of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:561-70.
76. Santillan A, Garg R, Zahurak ML, et al. Risk of epithelial ovarian cancer recurrence in patients with rising serum CA-125 levels within the normal range. *J Clin Oncol* 2005;23:9338-43.

77. Thigpen JT, Vance RB, Khansur T. Second-line chemotherapy for recurrent carcinoma of the ovary. *Cancer* 1993;71:1559-64.
78. Markman M, Markman J, Webster K, et al. Duration of response to second-line, platinum-based chemotherapy for ovarian cancer: implications for patient management and clinical trial design. *J Clin Oncol* 2004;22:3120-5.
79. Parmar MK, Ledermann JA, 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;361:2099-106.
80. Markman M, Rothman R, Hakes T, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;9:389-93.
81. Cass I, Baldwin RL, Varkey T, et al. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 2003;97:2187-95.
82. Winter WE, 3rd, Maxwell GL, Tian C, et al. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007;25:3621-7.
83. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;351:2519-29.
84. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002;20:1248-59.
85. Tingulstad S, Skjeldestad FE, Halvorsen TB, et al. Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2003;101:885-91.
86. Pectasides D, Papaxoinis G, Fountzilas G, et al. Epithelial ovarian cancer in Greece: a retrospective study of 1,791 patients by the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG). *Anticancer Res* 2009;29:745-51.
87. Bristow RE, Montz FJ, Lagasse LD, et al. Survival impact of surgical cytoreduction in stage IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999;72:278-87.
88. Markman M, Bundy BN, Alberts DS, et al. Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic

- Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2001;19:1001-7.
89. Muggia FM, Braly PS, Brady MF, et al. Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2000;18:106-15.
 90. Chi DS, Eisenhauer EL, Lang J, et al. What is the optimal goal of primary cytoreductive surgery for bulky stage IIIC epithelial ovarian carcinoma (EOC)? *Gynecol Oncol* 2006;103:559-64.
 91. Pectasides D, Fountzilas G, Aravantinos G, et al. Epithelial ovarian carcinoma in younger vs older women: is age an independent prognostic factor? The Hellenic Oncology Cooperative Group experience. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:1003-10.
 92. Zorn KK, Bonome T, Gangi L, et al. Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:6422-30.
 93. Nishizuka S, Chen ST, Gwadry FG, et al. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res* 2003;63:5243-50.
 94. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 2001;357:176-82.
 95. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203-13.
 96. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942-9.
 97. Lu H. FOXP3 expression and prognosis: role of both the tumor and T cells. *J Clin Oncol* 2009;27:1735-6.
 98. Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2067-77.

99. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 2007;19:2003-12.
100. Shin YJ, Choi JS, Choi JY, et al. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 mRNA in glial cells following focal cerebral ischemia in rats. *J Neuroimmunol*;229:81-90.
101. cancerpublications.com.
102. Amo Y, Masuzawa M, Hamada Y, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients. *Br J Dermatol* 2004;150:160-1.
103. Liu E, Morimoto M, Kitajima S, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2094-104.
104. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update*;18:436-57.
105. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
106. Gasparini G, Longo R, Toi M, et al. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:562-77.
107. Eskens FA. Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br J Cancer* 2004;90:1-7.
108. Muhlhauser J, Pili R, Merrill MJ, et al. In vivo angiogenesis induced by recombinant adenovirus vectors coding either for secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor. *Hum Gene Ther* 1995;6:1457-65.
109. Zeng G, Taylor SM, McColm JR, et al. Orientation of endothelial cell division is regulated by VEGF signaling during blood vessel formation. *Blood* 2007;109:1345-52.
110. Asahara T, Chen D, Takahashi T, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998;83:233-40.
111. Yen WC, Prudente RY, Corpuz MR, et al. A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, targretin) inhibits angiogenesis and metastasis in solid tumours. *Br J Cancer* 2006;94:654-60.

112. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-10.
113. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
114. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
115. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-6.
116. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001;7:987-9.
117. Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am* 1994;271:58-65.
118. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 1987;47:3039-51.
119. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096-103.
120. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008;8:579-91.
121. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:273-86.
122. Ratner M. Genentech discloses safety concerns over Avastin. *Nat Biotechnol* 2004;22:1198.
123. Cohen MH, Gootenberg J, Keegan P, et al. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2007;12:713-8.
124. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, et al. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist* 2009;14:1131-8.
125. Summers J, Cohen MH, Keegan P, et al. FDA drug approval summary: bevacizumab plus interferon for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist*;15:104-11.

126. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666-76.
127. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:569-79.
128. Eto M, Naito S. Molecular targeting therapy for renal cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006;11:209-13.
129. Flaherty KT. Sorafenib: delivering a targeted drug to the right targets. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:617-26.
130. Rock EP, Goodman V, Jiang JX, et al. Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* 2007;12:107-13.
131. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*;365:2473-83.
132. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*;365:2484-96.
133. Bamias A, Pignata S, Pujade-Lauraine E. Angiogenesis: a promising therapeutic target for ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*;84:314-26.
134. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol*;30:2039-45.
135. Pujade-Lauraine E HF, Weber B et al. AURELIA: A randomized phase III trial evaluating bevacizumab (BEV) plus chemotherapy (CT) for platinum (PT)-resistant recurrent ovarian cancer (OC). *J Clin Oncol* 2012 Abstract No: LBA5002
136. Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Genes Nutr* 2008;3:29-34.
137. Lyons JM, 3rd, Schwimer JE, Anthony CT, et al. The role of VEGF pathways in human physiologic and pathologic angiogenesis. *J Surg Res*;159:517-27.
138. Zucker S, Mirza H, Conner CE, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998;75:780-6.

139. Tam BY, Wei K, Rudge JS, et al. VEGF modulates erythropoiesis through regulation of adult hepatic erythropoietin synthesis. *Nat Med* 2006;12:793-800.
140. Waldner MJ, Wirtz S, Jefremow A, et al. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J Exp Med*;207:2855-68.
141. Mimura K, Kono K, Takahashi A, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:761-70.
142. Zindl CL, Chaplin DD. Immunology. Tumor immune evasion. *Science*;328:697-8.
143. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003;101:4878-86.
144. Bamias A, Koutsoukou V, Terpos E, et al. Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNFalpha in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2008;108:421-7.
145. Sambrook J FE, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. . Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
146. Bougateg F, Quemener C, Kellouche S, et al. EMMPRIN promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2alpha-mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2. *Blood* 2009;114:5547-56.
147. Georgaki S, Skopeliti M, Tsiatas M, et al. Phenoxodiol, an anticancer isoflavene, induces immunomodulatory effects in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2009;13:3929-38.
148. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:263-74.
149. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol* 2004;172:4618-23.

150. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55:4140-5.
151. Suzuki H, Onishi H, Wada J, et al. VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3^{high} CD4⁺ Treg. *Eur J Immunol*;40:197-203.
152. Basu A, Hoerning A, Datta D, et al. Cutting edge: Vascular endothelial growth factor-mediated signaling in human CD45RO⁺ CD4⁺ T cells promotes Akt and ERK activation and costimulates IFN-gamma production. *J Immunol*;184:545-9.
153. Crossland KD, Lee VK, Chen W, et al. T cells from tumor-immune mice nonspecifically expanded in vitro with anti-CD3 plus IL-2 retain specific function in vitro and can eradicate disseminated leukemia in vivo. *J Immunol* 1991;146:4414-20.
154. Ioannides CG, Platsoucas CD, Rashed S, et al. Tumor cytolysis by lymphocytes infiltrating ovarian malignant ascites. *Cancer Res* 1991;51:4257-65.
155. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 2002;71:907-20.
156. Mikko M, Wahlstrom J, Grunewald J, et al. Hypoxia but not cigarette smoke modulates VEGF secretion from human T cells. *Growth Factors* 2009;27:352-61.
157. Shin JY, Yoon IH, Kim JS, et al. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells. *Cell Immunol* 2009;256:72-8.
158. Ziogas AC, Gavalas NG, Tsiatas M, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int J Cancer*;130:857-64.
159. Markman M. Addition of bevacizumab to weekly paclitaxel significantly improves progression-free survival in heavily pretreated recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*;124:171; author reply -2.