



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής**

**Διευθυντής: Καθηγητής Ανδρέας Χ. Λάζαρης**

**«ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ  
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ»**

**ΕΥΘΥΜΙΑ Π. ΦΟΥΡΤΖΙΑΛΑ**

**Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ**

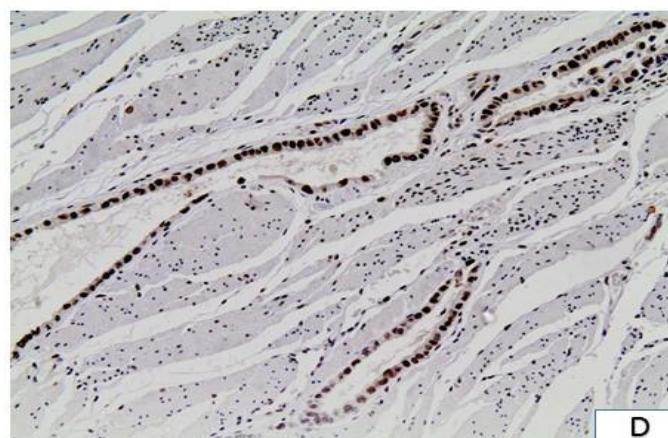
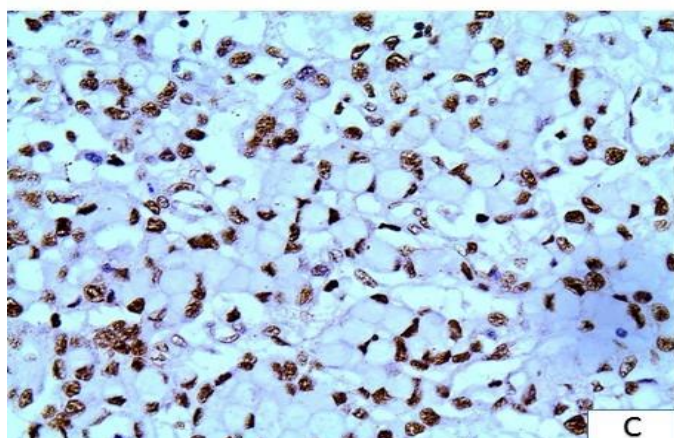
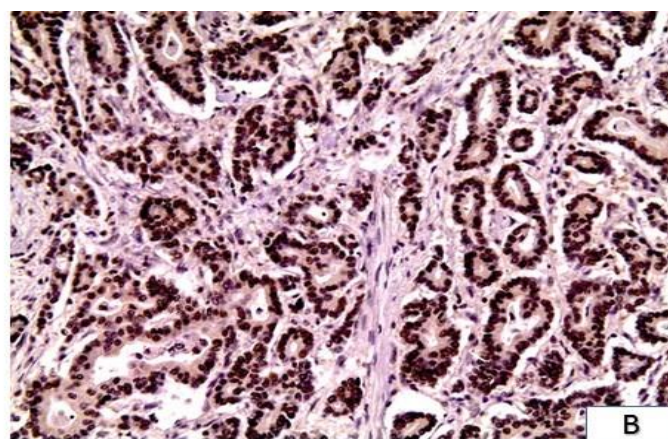
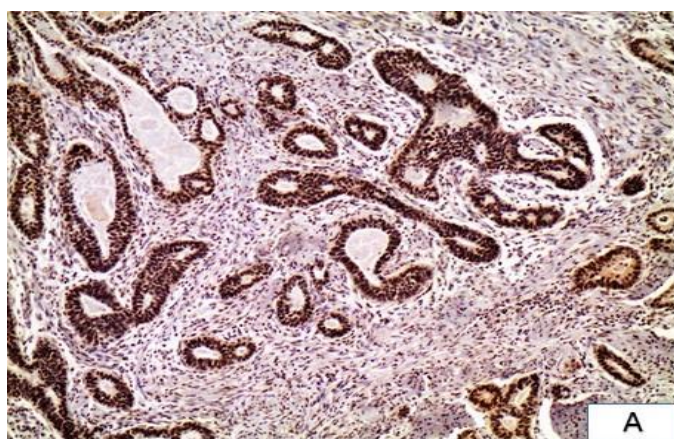
**Ιούλιος 2020**

ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:  
«ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ»  
Μελέτη των πρωτεϊνών RPA1, RPA2, RPA3, Ki67 & TopoIIa – Κλινικοπαθολογοανατομικές συσχετίσεις

---

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής  
Διευθυντής: Καθηγητής Ανδρέας Χ. Λάζαρης

ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:  
«ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ  
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ»  
Μελέτη των πρωτεϊνών RPA1, RPA2, RPA3, Ki67 & TopoIIa –  
Κλινικοπαθολογοανατομικές συσχετίσεις



**ΕΥΘΥΜΙΑ Π. ΦΟΥΡΤΖΙΑΛΑ**  
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, MSc

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2020

Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου: 02/04/2012

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Α. Π. 9786-20/07/2012

Μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Γακιοπούλου Χαρίκλεια (Επιβλέπουσα) – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
2. Κορκολοπούλου Πηνελόπη – Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
3. Λάζαρης Ανδρέας του Χρήστου – Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού του Θέματος 15/10/2012

Πρώτη έκθεση προόδου 9257/5-06-2013

Δεύτερη έκθεση προόδου 04-06-2014

Τρίτη έκθεση προόδου 14.15.018.105/05-05-2015

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής 24/06/2020

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε επί Προεδρίας **Πέτρου Π. Σφηκάκη** ως Πρόεδρου της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Σύμφωνα με το έγγραφο με Α.Π. 192.003.0009/30-06-20 σχετικά με τον ορισμό 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση υποψήφιας διδάκτορος και σχετικά με την από 24-06-2020/29795 πρόταση Συμβουλευτικής Επιτροπής, ορίστηκαν από τη Συνέλευση της Ιατρικής Σχολής, στη συνεδρίαση της 25-06-2020, τα εξής μέλη ΔΕΠ:

1. Γακιοπούλου Χαρίκλεια (Επιβλέπουσα) – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
2. Τσελένη – Μπαλαφούτα Σοφία – Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
3. Κορκολοπούλου Πηνελόπη – Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
4. Καβαντζάς Νικόλαος – Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
5. Λάζαρης Ανδρέας του Χρήστου – Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
6. Νόννη Αφροδίτη – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ
7. Θυμαρά Ειρήνη – Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ

Η παρούσα διατριβή έγινε δεκτή με βαθμό **Άριστα** (05/08/2020)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>

1.	Εισαγωγή .....	5.
1.1	Γενικά για το γαστρικό καρκίνο .....	5.
1.2	Επιδημιολογία και αιτιολογία .....	6.

#### Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

2.	Γαστρικός καρκίνος .....	13.
2.1	Μοριακή βιολογία γαστρικού καρκίνου .....	13.
2.2	Κληρονομούμενη επιδεκτικότητα .....	13.
2.3	Ο ρόλος της λοίμωξης από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και άλλοι ξενιστές – περιβαλλοντικοί παράγοντες .....	14.
2.4	Μοριακές μεταλλάξεις .....	15.
2.5	Μοντέλα γαστρικού καρκίνου .....	16.
2.6	Ιστολογική ταξινόμηση γαστρικών όγκων .....	17.
2.7	Ιστοπαθολογία .....	19.
2.7.1	Μακροσκοπική εικόνα .....	19.
2.7.2	Μικροσκοπική εικόνα .....	19.
2.8	Πρότυπα εξάπλωσης .....	22.
2.9	Σταδιοποίηση, κατάταξη και πρόγνωση .....	24.
2.9.1	AJCC/UICC σύστημα σταδιοποίησης .....	25.
2.10	Ταξινόμηση εκτομής .....	29.

#### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

3.	Μηχανισμός αγγειογένεσης στον καρκίνο γενικά .....	30.
3.1	Αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση του γαστρικού καρκίνου .....	30.
3.2	Αγγειογένεση στο γαστρικό καρκίνο .....	31.
3.2.1	VEGF – A .....	31.
3.2.2	Ιντερλευκίνη 8 .....	33.
3.2.3	PD – ECGF .....	34.
3.2.4	Αγγειοποιητίνη .....	35.
3.3	Λεμφαγγειογένεση στο γαστρικό καρκίνο .....	35.
3.4	Αλληλεπίδραση κυττάρων όγκου – στρώματος στην αγγειογένεση όγκου .....	37.
3.5	Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού διεγείρει την αγγειογένεση στο γαστρικό καρκίνο .....	39.

#### Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>

4.	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός .....	41.
4.1	Πολλαπλασιασμός φυσιολογικών κυττάρων .....	41.
4.2	Πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων .....	42.
4.3	Βιολογία κυτταρικού πολλαπλασιασμού .....	44.

4.4 Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού .....	48.
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
Κεφάλαιο 5 <sup>ο</sup>	
5. Μελέτη δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67 .....	53.
5.1 Γενικά .....	53.
5.2 Εκτίμηση της έκφρασης του ki-67 στο γαστρικό καρκίνο.....	53.
Κεφάλαιο 6 <sup>ο</sup>	
6. Μελέτη δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού TopoIIa .....	55.
6.1 Γενικά .....	55.
6.2 Εκτίμηση της έκφρασης της TopoIIa στο γαστρικό καρκίνο.....	57.
Κεφάλαιο 7 <sup>ο</sup>	
7. Μελέτη δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού RPA1,RPA2 και RPA3 (πρωτεΐνες αντιγραφήs A1, A2 και A3 στο γαστρικό καρκίνο	
7.1 Γενικά .....	60.
7.2 Εκτίμηση της έκφρασης των RPA1 και RPA2 στο γαστρικό καρκίνο.....	61.
7.2.1 Εισαγωγή .....	61.
7.2.2 Μέθοδοι – Ασθενείς .....	62.
7.2.3 Επεξεργασία δειγμάτων και ανοσοϊστοχημεία .....	63.
7.2.4 Στατιστική ανάλυση.....	64.
7.2.5 Αποτελέσματα.....	65.
7.2.6 Συμπεράσματα.....	67.
Πίνακες.....	73.
Εικόνες.....	74.
Περίληψη (στα Ελληνικά).....	81.
Περίληψη (στα Αγγλικά).....	82.
Δημοσίευση.....	83.
Βιβλιογραφία.....	91.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Γενικά στοιχεία

Το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου ήταν η κύρια αιτία θανάτων σχετιζόμενων με τον καρκίνο σε όλο τον κόσμο κατά το μεγαλύτερο μέρος του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Σήμερα έρχεται δεύτερος πίσω από τον καρκίνο του πνεύμονα και περίπου 875.000 νέες περιπτώσεις διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο παγκοσμίως. Σε πολλά μέρη του κόσμου, ωστόσο η επίπτωση του γαστρικού καρκίνου έχει μειωθεί, κυρίως λόγω αλλαγής των διατροφικών συνηθειών, της προετοιμασίας του φαγητού και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η μείωση της επίπτωσης είναι δραματική στις ΗΠΑ όπου αυτή η ασθένεια έρχεται έβδομη σαν αιτία θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο. Εκτιμάται ότι διαγιγνώσκονται 22.700 νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο στις ΗΠΑ με περίπου 11.800 θανάτους ανά έτος.

Η πρόγνωση για αυτήν την ασθένεια παραμένει πτωχή εκτός από μερικές χώρες. Οι εξηγήσεις για αυτά τα πτωχά αποτελέσματα είναι πολυπαραγοντικές. Η έλλειψη καθορισμένων παραγόντων κινδύνου και ειδικών συμπτωμάτων καθώς και η σχετικά χαμηλή επίπτωση έχουν συνδράμει στο να γίνεται η διάγνωση στις περισσότερες δυτικές χώρες κατά το τελευταίο στάδιο της νόσου. Στην Ιαπωνία, όπου ο καρκίνος του στομάχου ενδημεί, οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε πρώιμο στάδιο, γεγονός το οποίο αντικατοπτρίζεται από υψηλότερα ποσοστά συνολικής επιβίωσης.

Αν και η επίπτωση του γαστρικού καρκίνου έχει μειωθεί δραματικά κατά τον περασμένο αιώνα, αυτή η μείωση έχει περιοριστεί σε καρκίνους κάτω από την γαστροοισοφαγική συμβολή. Ο αριθμός των πρόσφατα διαγνωσθέντων περιπτώσεων αδενοκαρκινωμάτων της καρδιακής μοίρας του στομάχου και της γαστροοισοφαγικής συμβολής έχει αυξηθεί σημαντικά από τα μέσα της δεκαετίας του 1980. Αυτοί οι όγκοι θεωρούνται ότι είναι βιολογικά πιο επιθετικοί σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα σώματος και πυλωρού και πιο περίπλοκοι στο να αντιμετωπιστούν.

Η μόνη αποδεδειγμένη, δυνητικά θεραπευτική αντιμετώπιση για τον γαστρικό καρκίνο είναι η χειρουργική εκτομή τόσο για την μακροσκοπική όσο και για την μικροσκοπική νόσο. Ακόμα και μετά από αυτή τη θεραπευτική γαστρεκτομή, η νόσος υποτροπιάζει σε περιοχικά ή/και απομακρυσμένα σημεία στην πλειοψηφία των ασθενών. Οι προσπάθειες για τη βελτίωση αυτών των πτωχών αποτελεσμάτων έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη προ- και μετεγχειρητικών συστηματικών και τοπικών επικουρικών θεραπειών.

## 1.2 Επιδημιολογία και αιτιολογία

Τα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας για τον γαστρικό καρκίνο ποικίλουν πάρα πολύ στις διάφορες περιοχές του κόσμου. Τα υψηλότερα ποσοστά καρκίνου του στομάχου ανευρίσκονται στην Ιαπωνία, στην Νότια Αμερική και στην Ανατολική Ευρώπη με 30 έως 85 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. Αντίθετα, οι χαμηλές επίπτωσης περιοχές, όπως οι ΗΠΑ, το Ισραήλ και το Κουβέιτ εμφανίζουν μόνο 4 έως 8 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. Οι αριθμοί της θνησιμότητας προσεγγίζουν τους αριθμούς της επίπτωσης σε πολλές χώρες υψηλής επίπτωσης. Εντούτοις, στην Ιαπωνία έχει υπάρξει μια ελάττωση στους ρυθμούς θνησιμότητας ίσως σαν αποτέλεσμα του ομαδικού ελέγχου.

Οι μετανάστες βαθμιαία υιοθετούν τα ποσοστά επίπτωσης της χώρας στην οποία μεταναστεύουν υποδεικνύοντας ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι πρωταρχικής σημασίας στην αιτιολογία. Σε μια μελέτη, οι Ιάπωνες που μετανάστευσαν σε περιοχές χαμηλότερου κινδύνου είχαν έναν κίνδυνο για γαστρικό καρκίνο ο οποίος ήταν ενδιάμεσος ανάμεσα σε αυτόν του δυτικού πληθυσμού και σε αυτόν του ιαπωνικού πληθυσμού στην Ιαπωνία. Ο κίνδυνος για καρκίνο του στομάχου ήταν επίσης υψηλός στους απογόνους δεύτερης γενιάς που συνέχιζαν να ακολουθούν το ιαπωνικό διαιτολόγιο αλλά ήταν χαμηλός σε αυτούς που υιοθέτησαν το δυτικό διαιτολόγιο. Μια μελέτη σε Πολωνούς μετανάστες που ζούσαν στις ΗΠΑ για 10

χρόνια έδειξε ότι η επίπτωση του γαστρικού καρκίνου ελαττώθηκε και έγινε ενδιάμεση ανάμεσα στις συνήθεις επιπτώσεις των χωρών προέλευσης και μετανάστευσης. Αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι η περιβαλλοντική έκθεση στα πρώτα χρόνια της ζωής είναι απαραίτητη για τον καθορισμό του κινδύνου αλλά άλλοι περιβαλλοντικοί ή πολιτιστικοί παράγοντες συνεχίζουν να επηρεάζουν την προδιάθεση για καρκίνο.

Στις ΗΠΑ ο γαστρικός καρκίνος είναι σήμερα η έβδομη πιο συχνή αιτία θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο, αν και έναν αιώνα πριν ήταν η πιο κοινή αιτία. Τα ποσοστά επίπτωσης αυξάνονται και η επιβίωση ελαττώνεται με την ηλικία του πληθυσμού να αυξάνεται. Υπάρχουν ουσιαστικές φυλετικές διαφορές στην επίπτωση και στα ποσοστά θανάτων. Τα υψηλότερα ποσοστά θανάτων εμφανίζονται στους Αφροαμερικανούς άνδρες (περίπου 15 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμού ετησίως), ακολουθούν οι Καυκάσιοι άνδρες (περίπου η μισή επίπτωση της προηγούμενης), οι Αφροαμερικανές γυναίκες (ελάχιστα λιγότερη εκείνης των Καυκάσιων ανδρών) και οι Καυκάσιες γυναίκες (περίπου το μισό ποσοστό των Καυκάσιων ανδρών).

Οι στατιστικές επιβίωσης στις ΗΠΑ έχουν δείξει συνεχιζόμενη πρόοδο στα ποσοστά επιβίωσης κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, αν και ο λόγος για αυτή τη βελτίωση δεν είναι σαφής. Τα ποσοστά επιβίωσης είναι καλύτερα στις ομάδες με την χαμηλότερη επίπτωση γαστρικού καρκίνου.

Μια από τις πιο αξιοσημείωτες επιδημιολογικά παρατηρήσεις ήταν η αυξανόμενη επίπτωση του αδενοκαρκινώματος που αφορά τον εγγύς στόμαχο και τον απομακρυσμένο οισοφάγο. Αυτοί οι όγκοι θεωρούνται ότι έχουν διαφορετικούς αιτιολογικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, οι αλλοιώσεις του σώματος του στομάχου σχετίζονται με χαμηλή παραγωγή οξέος και λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, ενώ τα έλκη της καρδιάς δεν συνδέονται με κανένα από αυτά. Οι καρδιακές αλλοιώσεις έχουν μεγαλύτερα ποσοστά σε άνδρες και είναι πιο συχνά στους Καυκάσιους από τους Αφροαμερικανούς. Το 1991, οι Blot et al ανέφεραν ότι κατά



τη διάρκεια της περιόδου 1976 με 1987 παρατηρήθηκε μια μεταβολή στις εγγείς γαστρικές αλλοιώσεις. Ο ετήσιος ρυθμός αύξησης τους ήταν 4,3% για τους Καυκάσιους, 4,1% για τις Καυκάσιες γυναίκες, 3,6% για τους Αφροαμερικανούς και 5,6% για τις Αφροαμερικανές. Αυτές οι αυξήσεις λάμβαναν χώρα ταυτόχρονα με τις μειώσεις της επίπτωσης των όγκων του σώματος και του άντρου. Αυτά τα ετήσια ποσοστά αυξήσεων είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του καρκίνου του πνεύμονα ή του μελανώματος. Από το 1984 έως το 1987, οι καρκίνοι της καρδιάς του στομάχου έφτασαν το 47% όλων των γαστρικών καρκίνων στους Καυκάσιους άνδρες. Ευρωπαίοι ερευνητές έχουν αναφέρει παρόμοια στοιχεία. Αυτή η τάση είναι ανησυχητική επειδή οι εγγείς γαστρικοί καρκίνοι έχουν πτωχότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους απομακρυσμένους καρκίνους.

Για τους ενδημικούς τύπους γαστρικού καρκίνου, κυρίως του εντερικού τύπου, ο Correa έχει αξιώσει μια εξέλιξη από τον φυσιολογικό ιστό σε χρόνια ατροφική γαστρίτιδα, σε εντερική μεταπλασία και κατόπιν σε δυσπλασία. Έχει επίσης προτείνει ότι αυτή η εξέλιξη σχετίζεται με ποικίλους παράγοντες κινδύνου, με το ελικοβακτηρίδιο και με την υψηλή πρόσληψη αλατιού να σχετίζεται με χρόνια ατροφική γαστρίτιδα και την υψηλή πρόσληψη νιτρικού άλατος να οδηγεί σε εντερική μεταπλασία.

Η αιτιολογία του γαστρικού καρκίνου είναι μάλλον πολυπαραγοντική. Οι παράγοντες που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο για γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διακρίνονται σε επίκτητους και γενετικούς.

Οι επίκτητοι παράγοντες έχουν ως εξής:

- Διατροφικοί παράγοντες:
  - Υψηλή πρόσληψη αλατιού
  - Υψηλή κατανάλωση νιτρικού άλατος
  - Έλλειψη βιταμινών A και C
  - Ελλιπής προετοιμασία φαγητού

- Έλλειψη ψύξης
- Ελάχιστο πόσιμο νερό
- Επαγγελματικοί παράγοντες:
  - Εργάτες σε λάστιχα
  - Ανθρακωρύχοι
- Κάπνισμα
- Λοίμωξη με *H. pylori*
- Ιός Epstein-Barr
- Έκθεση σε ραδιενέργεια
- Προηγούμενη επέμβαση για καλοήγη γαστρική ελκωτική νόσο

Οι γενετικοί παράγοντες έχουν ως εξής:

- Ομάδα αίματος A
- Κακοήθης αναιμία
- Οικογενειακό ιστορικό
- Κληρονομικός μη πολυποειδικός καρκίνος του παχέος εντέρου
- Σύνδρομο Li-Fraumeni

Πρόδρομες αλλοιώσεις θεωρούνται:

- Οι αδеноματώδεις γαστρικοί πολύποδες
- Η χρόνια ατροφική γαστρίτιδα
- Η δυσπλασία
- Η εντερική μεταπλασία
- Η νόσος Menetrier

Η αιτιολογική βάση για την αυξανόμενη επίπτωση του εγγύς γαστρικού καρκίνου και του καρκίνου της γαστροοισοφαγικής συμβολής βρίσκεται κάτω από έντονη διερεύνηση. Η αυξανόμενη επικράτηση της παχυσαρκίας στις ΗΠΑ μπορεί να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει. Ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος και η υψηλή κατανάλωση θερμίδων έχουν συνδεθεί με το αδενοκαρκίνωμα του απομακρυσμένου

οισοφάγου και της καρδιάς. Η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση μπορεί να είναι ένας άλλος παράγοντας κινδύνου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση καπνού σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων σε αυτές τις περιοχές. Η χρήση ασπιρίνης και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων έχει σχετισθεί με χαμηλότερο κίνδυνο οισοφαγικού και καρδιακού καρκίνου.

Το 1965, ο Lauren περιέγραψε δύο ιστολογικούς τύπους του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, τον εντερικό και το διάχυτο, γεγονός το οποίο παρείχε ένα μοντέλο για την καλύτερη κατανόηση της αιτιολογίας και της επιδημιολογίας της νόσου. Ο εντερικός τύπος προκύπτει από προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις, γαστρική ατροφία ή εντερική μεταπλασία μέσα στον στόμαχο, συμβαίνει πιο συχνά στους άνδρες από ότι στις γυναίκες, είναι πιο συχνός σε μεγαλύτερα άτομα και αντιπροσωπεύει τον κυρίαρχο ιστολογικό τύπο σε περιοχές όπου ο καρκίνος του στομάχου ενδημεί, προτείνοντας έτσι μια δεσπόζουσα περιβαλλοντική αιτιολογία. Ο διάχυτος τύπος δεν προέρχεται τυπικά από αναγνωρίσιμες προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις. Είναι πιο συχνός σε περιοχές χαμηλής επίπτωσης, συμβαίνει ελαφρώς πιο συχνά στις γυναίκες και σε νεαρούς ασθενείς και έχει μια υψηλότερη συσχέτιση με οικογενειακά περιστατικά (ομάδα αίματος A), υποδεικνύοντας έτσι μια γενετική αιτιολογία. Αλλαγές στην επίπτωση του γαστρικού καρκίνου με τον καιρό φαίνεται να αντικατοπτρίζουν κυρίως μια αλλαγή στην επίπτωση του εντερικού τύπου.

Τα αδενοκαρκινώματα του σώματος και του άντρου του στομάχου έχουν μια στενή σύνδεση με την λοίμωξη από το *H. pylori*. Πρόκειται για μια κοινή λοίμωξη σε πολλά μέρη του κόσμου και σε μια μετα-ανάλυση πολλαπλών μελετών σχετίζεται με διπλάσιο κίνδυνο για τέτοιους καρκίνους. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η παραπάνω λοίμωξη αυξάνει την επίπτωση του γαστρικού καρκίνου δεν είναι σαφής αλλά φαίνεται ότι αυξάνει την επίπτωση της χρόνιας ατροφικής γαστρίτιδας, η οποία παράγει ένα περιβάλλον χαμηλής οξύτητας, καθώς και της μετάπλασης και της δυσπλασίας. Εντούτοις, αφού η λοίμωξη από *H. pylori* είναι παρούσα σε πάνω από το 50% του πληθυσμού σε πολλά μέρη του κόσμου, είναι σαφώς ένα όχι επαρκές γεγονός

για την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου. Πρόσφατες αναφορές υποδεικνύουν ότι γαστρικός καρκίνος αναπτύσσεται στο 5% των θετικών σε *H. pylori* για πάνω από 10 έτη ατόμων. Πολλαπλοί παράγοντες θεωρούνται ότι αλληλεπιδρούν με το *H. pylori* στην δημιουργία του γαστρικού καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της χρήσης καπνού, της ηλικίας μόλυνσης, του φύλου και της διατροφής (π.χ., χαμηλή πρόσληψη ασκορβικού οξέος, καροτένιου και βιταμίνης E).

Ο ακριβής τύπος της λοίμωξης από *H. Pylori* μπορεί να είναι επίσης ένας παράγοντας. Ένα πλήθος μελετών έχει προτείνει ότι τα *cagA* στελέχη του *H. pylori* τα οποία σχετίζονται με την έκφραση κυτταροτοξίνης προκαλούν μεγαλύτερη γαστρική λοίμωξη και συνδέονται στενά με τον γαστρικό καρκίνο.

Ένας αριθμός άλλων παραγόντων έχει μελετηθεί για τη σχέση τους με τη δημιουργία του γαστρικού καρκίνου. Υπάρχει σχετικά μικρή πληροφόρηση για να υποστηρίξει μια στενή σχέση ανάμεσα στον γαστρικό καρκίνο και την χρήση οινοπνεύματος, αν και μπορεί να υπάρχει μια μικρή σύνδεση ανάμεσα στη χρήση οινοπνεύματος και των όγκων της καρδιάς του στομάχου. Φαίνεται ότι υπάρχει μέτρια σύνδεση μεταξύ χρήσης καπνού και δημιουργίας γαστρικού καρκίνου γι' αυτό και είναι απαραίτητη η μακροχρόνια διακοπή καπνίσματος για την ελάττωση του κινδύνου.

Υπάρχουν αρκετά σοβαρές ενδείξεις ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει προστατευτική επίδραση έναντι στον γαστρικό καρκίνο και φαίνεται ότι η κατανάλωση φαγητών με υψηλή περιεκτικότητα σε αντιόξινα, συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών C και E, των καροτενοειδών και των φλαβονοειδών μπορεί να είναι ευεργετική. Το πράσινο τσάι, το οποίο περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες φαινολών, θα μπορούσε επίσης να είναι προστατευτικό αλλά τα αποτελέσματα δεν έχουν επαναληψιμότητα.

Τα στοιχεία για τα νιτρικά άλατα που υπάρχουν στα τρόφιμα με συντηρητικά είναι περιπεπλεγμένα. Τα νιτρικά άλατα μπορεί να μετατραπούν σε νιτρώδη άλατα και

κατόπιν σε νιτροζοενώσεις οι οποίες προκαλούν γαστρικό καρκίνο σε πειραματόζωα. Μερικές μελέτες έχουν δείξει μια έντονη συσχέτιση ανάμεσα στην υψηλή πρόσληψη νιτρικών αλάτων και στη δημιουργία γαστρικού καρκίνου ενώ άλλες δεν έχουν δείξει καμία συσχέτιση.

Η έκθεση σε ραδιενέργεια, ιδιαίτερα σε νεαρή ηλικία, φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο γαστρικού καρκίνου. Επίσης το έλκος του στομάχου σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο γαστρικού καρκίνου ενώ το έλκος του δωδεκαδακτύλου έχει μετρίως ελαττωμένο κίνδυνο.

## 2. Γαστρικός Καρκίνος

### 2.1 Μοριακή βιολογία του γαστρικού καρκίνου

Ο πιο συνηθισμένος τύπος γαστρικού καρκίνου είναι το αδενοκαρκίνωμα το οποίο διακρίνεται σε δύο υποτύπους, τον εντερικό και το διάχυτο. Διακρίνονται από διαφορετικές ανατομικές θέσεις στο στομάχι, από διαφορετικά κλινικά αποτελέσματα και από διαφορετική παθογένεση. Ο εντερικός τύπος του σποραδικού γαστρικού αδενοκαρκινώματος έχει μια χαρακτηριστική εξέλιξη από το φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο σε ατροφική έως χρόνια ατροφική γαστρίτιδα (τυπικά οφειλόμενη σε λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο) και από εκεί σε εντερική μεταπλασία (η οποία έχει μερικά αλληλεπικαλυπτόμενα και μερικά διαφορετικά χαρακτηριστικά σε σχέση με την εντερική μεταπλασία στον οισοφάγο Barrett) κατόπιν σε δυσπλασία και τέλος σε καρκίνο. Ο διάχυτος τύπος του γαστρικού αδενοκαρκινώματος είναι ακόμα πιο διηθητικός και επιθετικός στη συμπεριφορά του, έχει αλληλοεπικάλυψη με τον λοβιακού τύπο καρκίνο του μαστού και μπορεί να επισημανθεί από την απώλεια της E-καδερίνης.

### 2.2 Κληρονομούμενη επιδεκτικότητα

Μελέτες που διερευνούν περιπτώσεις-μάρτυρες έχουν καταδείξει έως και τριπλασιασμό των αυξήσεων του κινδύνου για γαστρικό καρκίνο ανάμεσα σε συγγενείς ασθενών με γαστρικό καρκίνο. Μελέτες σε μονοζυγωτικούς διδύμους έχουν δείξει μια μικρή τάση έναντι στην αυξημένη συμπτωματικότητα των γαστρικών καρκίνων σε σύγκριση με τους διζυγωτικούς διδύμους. Μεγάλες οικογένειες με μια αυτοσωμικά κυρίαρχη και ιδιαίτερα διεισδυτική κληρονομούμενη προδιάθεση για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου είναι σπάνιες. Εντούτοις, οι αρχικού σταδίου γαστρικοί καρκίνοι διάχυτου τύπου έχουν περιγραφεί και συνδεθεί με τη θέση της E-καδερίνης/CDH1 στο χρωμόσωμα 16q και έχουν σχετισθεί με μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο. Αυτό το εύρημα έχει επιβεβαιωθεί σε άλλες μελέτες με γαστρικούς καρκίνους σε ένα

σχετικά υψηλό ποσοστό (67% - 83%). Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος μετάλλαξης της E-καδερίνης θα έπρεπε να γίνεται στο κατάλληλο κλινικό πλαίσιο. Στην ουσία η προφυλακτική γαστρεκτομή θα έπρεπε να αποτελεί ισχυρό ενδεχόμενο σε οικογένειες με μετάλλαξη της E-καδερίνης στη βλαστική σειρά ακόμα και χωρίς μακροσκοπικές βλεννογονικές ανωμαλίες κατά την ενδοσκοπική εξέταση του στομάχου.

Ο κληρονομούμενος μη πολυποειδικός καρκίνος του παχέος εντέρου αφορά μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς των γονιδίων επιδιόρθωσης του παράταιρου DNA. Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα μπορεί να παρατηρηθεί σε οικογένειες με τον παραπάνω καρκίνο. Οι γαστρικοί καρκίνοι έχουν επίσης σημειωθεί να συμβαίνουν σε ασθενείς με οικογενή αδενοματώδη πολυποδίαση και με σύνδρομα Peutz-Jeghers.

### **2.3 Ο ρόλος της λοίμωξης από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και**

#### **άλλοι ξενιστές-περιβαλλοντικοί παράγοντες**

Ως συμβιών οργανισμός, η λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο. Παρά την κατάταξή της από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σαν καρκινογόνο τάξης I, η λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού δεν οδηγεί πάντα σε γαστρικό καρκίνο. Αυτό υπογραμμίζει τη σπουδαιότητα άλλων παραγόντων, όπως της τοξικότητας, των περιβαλλοντικών παραγόντων και παραγόντων ξενιστών καθώς και των γενετικών πολυμορφισμών. Ο φαινότυπος της ομάδας αίματος A έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με γαστρικούς καρκίνους. Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού μπορεί να προσκολληθεί στο αντιγόνο της ομάδας αίματος Lewis υποδεικνύοντας έναν παράγοντα για αυξημένο κίνδυνο γαστρικού καρκίνου. Μικρές παραλλαγές στα αλληλία ενός γονιδίου βλεννίνης, του Muc 1, βρέθηκαν να σχετίζονται με ασθενείς με γαστρικό καρκίνο όταν συγκρίθηκαν με έναν πληθυσμό-μάρτυρα αιμοδοτών. Η λοίμωξη με τον ιό Epstein-Barr έχει σημειωθεί σε πολλά καρκινώματα του στομάχου (λεμφοεπιθηλιωδή τύπου), αν και η σημασία αυτού δεν είναι ξεκάθαρη.

## 2.4 Μοριακές γενετικές μεταλλάξεις

Σε αντίθεση με τον καρκίνο του παγκρέατος και τον καρκίνο του παχέος εντέρου στους οποίους συγκεκριμένα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια μεταλλάσσονται με μεγάλη συχνότητα, τέτοιου βαθμού μετάλλαξη δεν παρατηρείται στους σποραδικούς γαστρικούς καρκίνους. Μια λογικά επικρατούσα μεταβολή είναι η μικροδορυφορική αστάθεια, το αποτέλεσμα των αλλαγών στα γονίδια επιδιόρθωσης του παράταιρα συνδυασμένου DNA. Η μικροδορυφορική αστάθεια και σχετιζόμενες μεταβολές του TGF-β II υποδοχέα και των IGFRII, BAX, E2F-4, hMSH3 και hMSH6 γονιδίων έχουν βρεθεί σε ένα υποσύνολο καρκινωμάτων του στομάχου. Μικροδορυφορική αστάθεια έχει βρεθεί σε ποσοστό 13% έως 44% των σποραδικών καρκινωμάτων του στομάχου. Υψηλός βαθμός μικροδορυφορικής αστάθειας συμβαίνει σε γαστρικούς καρκίνους εντερικού τύπου με ελαττωμένη συμμετοχή λεμφαδένων, με ενισχυμένη λεμφική διήθηση και καλύτερη πρόγνωση. Αυτό θυμίζει καρκίνους του παχέος εντέρου που σχετίζονται με τους HNPCC.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 συνεχώς μεταβάλλεται στους περισσότερους γαστρικούς καρκίνους. Σε μια μελέτη της περιοχής του υποκινητή του p16 σε γαστρικούς καρκίνους, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών (41%) εμφάνισαν μεθυλίωση στη νησίδα του CpG. Πολλές περιπτώσεις με υπερμεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή εμφάνισαν τον φαινότυπο με υψηλό βαθμό μικροδορυφορικής αστάθειας και πολλαπλές θέσεις της μεθυλίωσης, συμπεριλαμβανομένης και της hMLH1 περιοχής υποκίνησης.

Πολλοί σποραδικοί διάχυτου τύπου γαστρικοί καρκίνοι εμφανίζουν μεταβολή στην E-καδερίνη, ένα διαμεμβρανικό, ασβέστιο-εξαρτώμενο μόριο προσκόλλησης το οποίο είναι σημαντικό για τις ομόφυλες και ετερόφυλες αλληλεπιδράσεις των επιθηλιακών κυττάρων. Η E-καδερίνη μπορεί να ρυθμίζεται προς τα κάτω σε



καρκινογένεση του στομάχου (ειδικότερα σε διάχυτο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου) από σημειακή μετάλλαξη, από διαγραφή αλληλίων ή από μεθυλίωση υποκινητή. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης, η μεταγραφή της E-καδερίνης μπορεί να διακοπεί από μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι Snail και Slug. Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση είναι μια σπουδαία διαδικασία στην καρκινογένεση του στομάχου, όπως πιστεύεται ότι είναι στον καρκίνο του μαστού. Μεταβολές σε έναν αριθμό άλλων ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχουν περιγραφεί σε ένα πολύ μικρό υποσύνολο γαστρικών καρκίνων με τη βοήθεια της PCR ή της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης, αλλά η ποικιλία στις μεθόδους και η έλλειψη ομοιομορφίας στον ποιοτικό έλεγχο καθιστούν αυτές τις παρατηρήσεις λιγότερο αξιόπιστες. Όπως με τον καρκίνο του οισοφάγου, υψηλής ανάλυσης μελέτες σαν τις συστοιχίες μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού, τις συστοιχίες χρωμοσωμικού υβριδισμού (για την εκτίμηση χρωμοσωμικών προσθηκών ή απωλειών), τη σκιαγράφηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών και την βασιζόμενη στους ιστούς και το πλάσμα πρωτεομική μπορεί να αποκαλύψουν μοριακές υπογραφές (ακόμα και συγκεκριμένα γονίδια ή/και μονοπάτια) οι οποίες ορίζουν υποτύπους γαστρικού καρκίνου, διαφορετικά στάδια γαστρικών καρκίνων και συσχετισμούς με κλινικά αποτελέσματα.

## 2.5 Μοντέλα γαστρικού καρκίνου

Γενετικά κατασκευασμένα μοντέλα μυών για τον καρκίνο του στομάχου έχουν ανακύψει ραγδαία τα τελευταία χρόνια, υποδεικνύοντας ότι το ενεργοποιημένο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt και οι επαγόμενοι της προς τα κάτω ρύθμισης τελεστές, η απενεργοποίηση του p53, του APC και του Smad4 γονιδίου καθώς και η γαστρίνη αποτελούν σημαντικούς παράγοντες. Οι καρκίνοι του στομάχου σε αυτά τα μοντέλα

διευκολύνονται με την ταυτόχρονη λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο. Επιπλέον, η στρατολόγηση βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών μπορεί να εντείνει τις επιπτώσεις της λοίμωξης με ελικοβακτηρίδιο κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης.

## 2.6 Ιστολογική ταξινόμηση γαστρικών όγκων

Περίπου το 95% όλων των κακοήθων γαστρικών νεοπλασμάτων είναι αδενοκαρκινώματα και γενικά ο όρος γαστρικός καρκίνος αναφέρεται στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου. Άλλοι κακοήθεις όγκοι είναι πολύ σπάνιοι και περιλαμβάνουν το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου, το αδеноακάνθωμα, τους καρκινοειδείς όγκους και το λειομυοσάρκωμα. Αν και δεν ανευρίσκεται καθόλου φυσιολογικός λεμφοειδής ιστός στο γαστρικό βλεννογόνο, ο στόμαχος είναι η πιο συνηθισμένη θέση για τα λεμφώματα του γαστρεντερικού σωλήνα. Η αυξημένη γνώση της σχέσης μεταξύ των λεμφωμάτων MALT και του *H. pylori* μπορεί να εξηγήσει μερικώς την αύξηση στην επίπτωση. Η διαφορική διάγνωση ανάμεσα στο αδενοκαρκίνωμα και το λέμφωμα μπορεί μερικές φορές να είναι δύσκολη αλλά είναι απαραίτητη επειδή η σταδιοποίηση, η θεραπεία και η πρόγνωση είναι διαφορετικές για κάθε ασθένεια.

Ακολουθεί αναλυτικός πίνακας ιστολογικής ταξινόμησης των γαστρικών καρκίνων σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας):

- Επιθηλιακοί όγκοι
  - Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία – Αδένωμα
  - Καρκίνωμα:
    - Αδενοκαρκίνωμα εντερικού / διάχυτου τύπου
    - Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα
    - Σωληνώδες αδενοκαρκίνωμα
    - Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα

- Καρκίνωμα με κύτταρα δίκην σφραγηστήρος δακτυλίου
  - Αδενοπλακώδες καρκίνωμα
  - Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων
  - Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
  - Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα
  - Άλλοι όγκοι
- Καρκινοειδές (καλά διαφοροποιημένη ενδοκρινής νεοπλασία)
- Μη επιθηλιακοί όγκοι
    - Λειομύωμα
    - Σβάννωμα
    - Όγκος κοκκιωδών κυττάρων
    - Όγκος Glomus (γνωστό και ως nonchromaffin paraganglioma)
    - Λειομυοσάρκωμα
    - GIST
      - Καλοήθης όγκος
      - Αβέβαιης κακοήθους δυνητικότητας
      - Κακοήθης όγκος
    - Σάρκωμα Kaposi
    - Άλλοι όγκοι
    - Κακοήθη λεμφώματα
      - Λέμφωμα περιφερειακής ζώνης των β-κυττάρων τύπου MALT
      - Λέμφωμα κυττάρων μανδύα
      - Διάχυτο λέμφωμα μεγάλων β-κυττάρων
      - Άλλα
  - Δευτερεύοντες όγκοι

## 2.7 Ιστοπαθολογία

**2.7.1. Μακροσκοπική εικόνα.** Έχουν προταθεί πολλά σχήματα ταξινόμησης βασιζόμενα στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των γαστρικών καρκίνων. Η κατάταξη κατά Borrmann χωρίζει τους γαστρικούς καρκίνους σε πέντε τύπους ανάλογα με την μακροσκοπική εμφάνιση. Ο τύπος I αντιπροσωπεύει πολυποειδείς ή μυκητοειδείς καρκίνους(εικόνα ), ο τύπος II ελκωτικές αλλοιώσεις περιβαλλόμενες από επηρμένα όρια, ο τύπος III εξελκωμένες αλλοιώσεις που διηθούν το τοίχωμα του στομάχου, ο τύπος IV διάχυτα διηθητικούς όγκους και ο τύπος V μη ταξινομήσιμους καρκίνους.

### 2.7.2. Μικροσκοπική εικόνα

**Ιστολογική Ταξινόμηση.** Η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη κατάταξη του γαστρικού καρκίνου είναι αυτή κατά Lauren. Διακρίνει τους γαστρικούς καρκίνους σε εντερικού και σε διάχυτου τύπου. Αυτό το σχήμα κατηγοριοποίησης, βασισμένο στην ιστολογία των όγκων, χαρακτηρίζει αποτελεσματικά δύο ποικιλίες γαστρικού αδενοκαρκινώματος οι οποίες εμφανίζουν ευκρινώς διαφορετική παθολογία, επιδημιολογία και αιτιολογία. Ο εντερικός τύπος αντιπροσωπεύει έναν διαφοροποιημένο καρκίνο με τάση να σχηματίζει αδένες. Αντίθετα, ο διάχυτος τύπος παρουσιάζει πολύ μικρή συνοχή κυττάρων και έχει μια τάση για εκτεταμένη υποβλεννογόνια εξάπλωση και ταχεία μετάσταση. Αν και οι διάχυτου τύπου καρκίνοι σχετίζονται γενικά με ένα χειρότερο αποτέλεσμα από ότι οι εντερικού τύπου, αυτό το εύρημα δεν είναι ανεξάρτητο από το στάδιο TNM.

Γενικές διαφορές εντερικού και διάχυτου τύπου:

#### ➤ *Εντερικού τύπου*

- Συχνότερα στο άντρο
- ↑ Ηλικία
- Σε έδαφος εντερικής μετάπλασης
- Σχέση με περιβαλλοντικούς παράγοντες

- Μετάσταση σε ήπαρ

➤ *Διάχυτου τύπου*

- Συχνότερα στο σώμα
- ↓ ηλικία
- Δεν συνοδεύονται από εντερική μετάπλαση
- Γονιδιακή προδιάθεση
- Μετάσταση σε λεμφαδένες, περιτόναιο

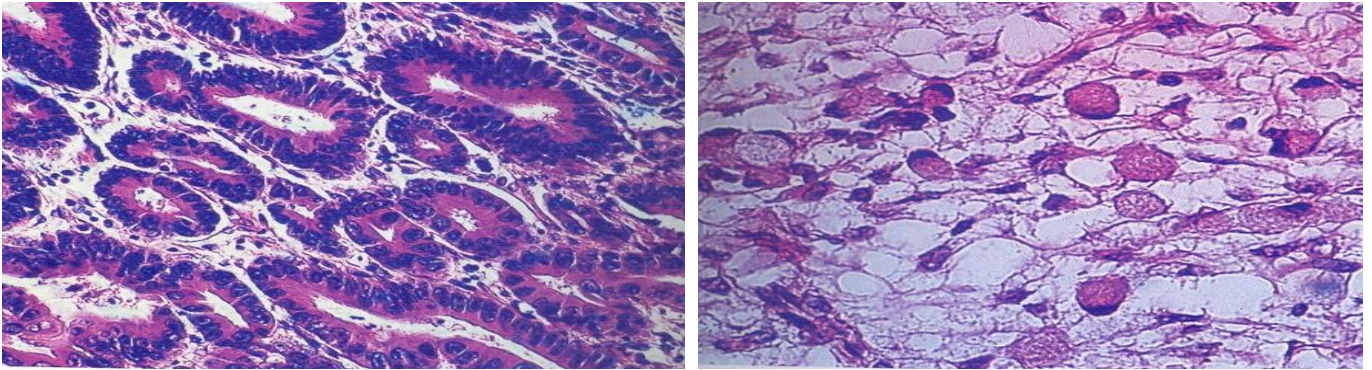
Ιστολογικές διαφορές εντερικού και διάχυτου τύπου:

➤ *Εντερικού τύπου*

- Συνήθως σε έδαφος εντερικής μετάπλασης
- Αναγνωρίζονται αδενικοί σχηματισμοί επενδύμενοι από καλυκοειδή κύτταρα περιέχοντα όξινη βλέννη και απορροφητικά κύτταρα με ψυκτροειδή παρυφή.
- Έκκριση → εξωκυττάρια

➤ *Διάχυτου τύπου*

- Ασυνήθης η συνύπαρξη εντερικής μετάπλασης
- Συνήθως μικρά, στρογγυλά κύτταρα με χαλαρή συνοχή, διασκορπισμένα, μεμονωμένα ή σε μικρές αθροίσεις περιέχοντα όξινη ή ουδέτερη βλέννη
- Μικρή εξωκυττάρια βλέννη
- Δεσμοπλασία, ↓ φλεγμονώδης αντίδραση
- Μικρότερη μιτωτική δραστηριότητα



Ο Ming έχει προτείνει ένα ιστομορφολογικό σύστημα σταδιοποίησης το οποίο χωρίζει τον γαστρικό καρκίνο είτε σε έναν καλής πρόγνωσης απωθητικό τύπο είτε σε έναν πτωχής πρόγνωσης διηθητικό τύπο. Με βάση την ανάλυση 171 γαστρικών καρκίνων, οι απωθητικού τύπου όγκοι ήταν ομοιόμορφα πολυποειδείς ή επιφανειακοί μακροσκοπικά, ενώ οι διηθητικοί όγκοι ήταν σχεδόν πάντα διάχυτοι. Οι μακροσκοπικά εξελκωμένες αλλοιώσεις μοιράζονταν εξίσου ανάμεσα στους επεκτατικούς και τους διηθητικούς τύπους.

### Ιστολογικές ταξινομήσεις γαστρικού καρκίνου

- **Lauren's (1965)**
  - Εντερικού τύπου
  - Διάχυτου τύπου
- **Ming's (1977)**
  - Διηθητικό
  - Απωθητικό
- **Goseki's (1992)**
  - Βαθμοί I-II-III-IV
  - Συνδυασμός βαθμού διαφοροποίησης
  - (Αδενοειδής διάταξη) και παραγωγή βλέννης
- **Carneiro's (1997)**
  - Αδενικός
  - Από μεμονωμένα κύτταρα

- Συμπαγής
  - Μικτός
- **WHO (2010)**

### **Βαθμός διαφοροποίησης**

Η κατάταξη κατά Broder διαβαθμίζει τους όγκους ιστολογικά από το 1 (καλά διαφοροποιημένοι) έως το 4 (αναπλαστικοί). Οι Bearzi και Ranaldi έχουν συσχετίσει το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης με την μακροσκοπική εμφάνιση 41 πρωτοπαθών γαστρικών καρκίνων εξεταζόμενους με ενδοσκόπηση. Το 90% των προβαλλόντων ή επιφανειακών καρκίνων ήταν καλά διαφοροποιημένοι ( grade 1 κατά Broder), ενώ σχεδόν οι μισοί από όλους τους ελκωτικούς όγκους ήταν πτωχά διαφοροποιημένοι ή διάχυτα διηθητικοί (grade 3 και 4 κατά Broder).

Η μακροσκοπική μορφολογική εμφάνιση του γαστρικού καρκίνου και ο βαθμός της ιστολογικής διαφοροποίησης δεν αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες.

## **2.8 Πρότυπα εξάπλωσης**

Τα καρκινώματα του στομάχου μπορούν να εξαπλωθούν με τοπική επέκταση ώστε να περιλάβουν παρακείμενες δομές και μπορούν να αναπτύξουν λεμφογενείς μεταστάσεις, περιτοναϊκές μεταστάσεις και απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αυτές οι επεκτάσεις μπορούν να συμβούν μέσω των ιδιοτήτων του όγκου για τοπική διήθηση, μέσω λεμφικής εξάπλωσης ή μέσω αιματογενούς διασποράς. Η αρχική ανάπτυξη του όγκου συμβαίνει με την διείσδυση μέσα στο γαστρικό τοίχωμα, με την επέκταση διαμέσου του τοιχώματος και την ανάμειξη ενός αυξανόμενου ποσοστού του στομάχου. Οι δυο τρόποι τοπικής επέκτασης που μπορεί να έχουν μέγιστο θεραπευτικό αντίκτυπο είναι η διείσδυση του όγκου διαμέσου του ορογόνου χιτώνα του στομάχου, όπου ο κίνδυνος για εισβολή του όγκου σε γειτονικές δομές ή

περιτοναϊκή εξάπλωση είναι αυξημένος, και η διασπορά μέσω του λεμφικού συστήματος. Ο Zinninger έχει εκτιμήσει την εξάπλωση στο γαστρικό τοίχωμα και έχει βρει μια μεγάλη ποικιλία στην έκτασή της. Η εξάπλωση του όγκου γίνεται συνήθως μέσα από τα ενδοτοιχωματικά λεμφαγγεία ή τα υποορογόνια στρώματα. Η τοπική επέκταση μπορεί επίσης να συμβεί μέσα στον οισοφάγο ή το δωδεκαδάκτυλο. Η επέκταση στο δωδεκαδάκτυλο γίνεται κυρίως μέσα από το μυϊκό χιτώνα με άμεση διήθηση και μέσα από υποορογόνια λεμφαγγεία αλλά γενικά δεν έχει μεγάλη έκταση. Η επέκταση στον οισοφάγο συμβαίνει κυρίως μέσω των υποβλεννογόνιων λεμφαγγείων. Η τοπική επέκταση δεν συμβαίνει μόνο με ενδοτοιχωματική εξάπλωση αλλά και με διήθηση του τοιχώματος ώστε να συμπεριλάβει γειτονικές δομές. Η επέκταση μπορεί να συμβεί μέσω του γαστρικού ορογόνου ώστε να αφορά το επίπλουν, τον σπλήνα, τα επινεφρίδια, το διάφραγμα, το ήπαρ, το πάγκρεας ή το παχύ έντερο. Στοιχεία από μελέτες δείχνουν ότι το 60% με 90% των ασθενών είχαν πρωτοπαθείς όγκους που διαπερνούσαν τον ορογόνο χιτώνα ή εισέβαλαν σε γειτονικές δομές και ότι τουλάχιστον το 50% είχαν λεμφαδενικές μεταστάσεις. Από τις 1.577 περιπτώσεις πρωτοπαθούς γαστρικού καρκίνου που εισήχθησαν στο Κέντρο Καρκίνου Memorial Sloan-Kettering μεταξύ του 1995 και του 1998, το 60% των περιπτώσεων που είχαν υποστεί εκτομή είχαν ενδείξεις για διήθηση του ορογόνου και το 68% είχαν θετικούς λεμφαδένες. Μεταστάσεις σε λεμφαδένες βρέθηκαν στο 18% των pT1 αλλοιώσεων μετά από RO εκτομή σε 941 ασθενείς. Αυτό το ποσοστό αυξήθηκε σημαντικά σε 60% σε pT2 αλλοιώσεις. Η υψηλότερη επίπτωση της λεμφικής μετάστασης παρατηρήθηκε σε όγκους που διαχέονταν σε ολόκληρο τον στόμαχο. Οι όγκοι που βρίσκονταν στην γαστροοισοφαγική συμβολή είχαν επίσης μια υψηλή επίπτωση σε σχέση με άλλα σημεία. Το πρότυπο της λεμφαδενικής μετάστασης επίσης διαφέρει ανάλογα με την τοποθεσία της πρωτοπαθούς εστίας, με τους λεμφαδένες της αριστερής γαστρικής αρτηρίας να βρίσκονται σταθερά σε αυξημένο κίνδυνο για λεμφαδενική μετάσταση άσχετα με την τοποθεσία του όγκου.

Ο γαστρικός καρκίνος υποτροπιάζει σε πολλά σημεία, τόσο τοποπεριοχικά όσο και συστηματικά. Τα αναφερόμενα πρότυπα υποτροπής διαφέρουν μεταξύ τους. Αυτές



οι διαφορές σχετίζονται πιθανότατα με τις παραμέτρους του ασθενούς που έχουν εκτιμηθεί, με το χρόνο που καθορίστηκε η υποτροπή και με τη μέθοδο καθορισμού του προτύπου υποτροπής. Σε μια πολυπαραγοντική ανάλυση των περιπτώσεων των ασθενών από το προαναφερθέν κέντρο, η περιτοναϊκή υποτροπή σχετιζόταν με το γυναικείο φύλο, με το προχωρημένο στάδιο T και με απομακρυσμένους και διάχυτους τύπους όγκων. Η τοποπεριοχική υποτροπή σχετιζόταν με εγγύς τοποθεσία, πρώιμο στάδιο T και εντερικού τύπου όγκους. Σε μια άλλη μελέτη από την Κορέα, αναλύθηκαν πρότυπα υποτροπής σε 2.038 ασθενείς οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν με δυνητικά θεραπευτική γαστρεκτομή. Από τους 508 ασθενείς που εμφάνισαν υποτροπή, στο 33% αφορούσε τοποπεριοχικά σημεία, στο 44% ήταν περιτοναϊκή και στο 38% ήταν απομακρυσμένη. Αυτά τα στοιχεία βοηθούν να ταυτοποιηθούν ασθενείς που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για ειδικές μορφές υποτροπής και θα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη επικουρικής θεραπείας. Είναι σαφές ότι απαιτείται αυξημένη προσοχή στις μεθόδους ελέγχου τόσο της τοποπεριοχικής όσο και της συστηματικής νόσου ώστε να επιτευχθούν μακροπρόθεσμα αποτελέσματα.

## 2.9 Σταδιοποίηση, κατάταξη και πρόγνωση

Η ομοιόμορφη και ακριβής σταδιοποίηση του γαστρικού καρκίνου είναι απαραίτητη για την πρόβλεψη της πρόγνωσης και την εκτίμηση του αποτελέσματος. Για ασθενείς με χειρουργικά θεραπευμένο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου θα έπρεπε να πραγματοποιείται τόσο παθολογοανατομική σταδιοποίηση (είτε με το σύστημα της American Joint Committee on Cancer/ International Union Against Cancer είτε με το ιαπωνικό σύστημα) όσο και κατάταξη της πληρότητας της εκτομής. Επιπρόσθετα, αν και όχι τυπικά συστατικά της AJCC ομάδας σταδιοποίησης, ο ιστολογικός βαθμός και τύπος και, όταν είναι διαθέσιμη, η κυτταρολογική κατάσταση της περιτοναϊκής έκπλυσης θα έπρεπε να καταγράφονται. Η τελευταία είναι σημαντική επειδή η

παρουσία ελεύθερων περιτοναϊκών καρκινικών κυττάρων έχει δειχθεί από μελέτες ότι συνεπάγεται μια πρόγνωση συγκρίσιμη με αυτή της σπλαγχνικής μεταστατικής νόσου.

### 2.9.1 AJCC/UICC TNM σύστημα σταδιοποίησης

Η κατάταξη TNM του 2010 του Π.Ο.Υ. βρίσκει εφαρμογή στα καρκινώματα. Πρόκειται για ιστολογική επιβεβαίωση των νόσων. Όλοι οι όγκοι με επίκεντρο στο στομάχι μεγαλύτερο από 2 εκατοστά από την γαστροοισοφαγική συμβολή ή αυτοί μέσα στα 2 εκατοστά από την γαστροοισοφαγική συμβολή χωρίς επέκταση μέσα στον οισοφάγο σταδιοποιούνται με αυτό το σύστημα κατάταξης.

Παρακάτω αναφέρονται οι διαδικασίες με τις οποίες γίνεται η εκτίμηση των T, N και M κατηγοριών.

T κατηγορίες:

- Φυσική εξέταση
- Απεικονιστική ενδοσκόπηση και/ή
- Χειρουργική διερεύνηση

N κατηγορίες:

- Φυσική εξέταση
- Απεικονιστική ενδοσκόπηση και/ή
- Χειρουργική διερεύνηση

M κατηγορίες:

- Φυσική εξέταση
- Απεικονιστική ενδοσκόπηση και/ή
- Χειρουργική διερεύνηση

Σε αυτό το σύστημα σταδιοποίησης το στάδιο του όγκου (T) καθορίζεται από το βάθος της διήθησης του όγκου στο τοίχωμα του στομάχου και από την επέκταση σε παρακείμενες δομές.

Το λεμφαδενικό στάδιο (N) βασίζεται στον αριθμό των εμπλεκόμενων λεμφαδένων, ένα κριτήριο το οποίο μπορεί να προβλέψει το αποτέλεσμα ακριβέστερα από ότι η θέση των αντίστοιχων λεμφαδένων. Οι όγκοι με 1 έως 2 λεμφαδένες ταξινομούνται ως N1, με 3 έως 6 ως N2, με 7 έως 15 ως N3a και με 16 ή περισσότερους ως N3b. Η χρησιμότητα των αριθμητικών ουδών για λεμφαδενική ταξινόμηση έχει γίνει αυξανόμενα αποδεκτή, αν και η έκταση της λεμφαδενεκτομής και η ακαμψία της παθολογικής εκτίμησης μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Η ουδός προσέγγισης βασίζεται σε παρατηρήσεις ότι η επιβίωση ελαττώνεται καθώς αυξάνει ο αριθμός των μεταστατικών λεμφαδένων και ότι υπάρχουν μειώσεις στην επιβίωση όταν εμπλέκονται 4 ή περισσότεροι και πάλι στους 7 ή και περισσότερους λεμφαδένες.

Οι περιοχικοί λεμφαδένες του στομάχου είναι οι περιγαστρικοί κατά μήκος του μείζονος και του ελάσσονος τόξου, οι λεμφαδένες κατά μήκος της αριστερής κοινής ηπατικής, της σπληνικής και της κοιλιακής αρτηρίας καθώς και οι λεμφαδένες του δωδεκαδακτύλου. Ανάμιξη άλλων ενδοκοιλιακών λεμφαδένων όπως των οπισθοπαγκρεατικών, του μεσεντερίου και των παραορτικών ταξινομείται ως απομακρυσμένη μετάσταση.

Αναλυτικά έχουμε τα εξής:

- Πρωτοπαθής όγκος (T)
  - TX: ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
  - T0: καμία ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
  - Tis: καρκίνωμα insitu (ενδοεπιθηλιακός όγκος χωρίς διήθηση της βασικής μεμβράνης – υψηλού βαθμού δυσπλασία)
  - T1: ο όγκος διηθεί τη βασική μεμβράνη, τον μυϊκό βλεννογόνο ή υποβλεννογόνο

T1a: ο όγκος διηθεί τη βασική μεμβράνη και το μυϊκό βλεννογόνο

T1b: ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνο

➤ T2: ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα

➤ T3: ο όγκος διηθεί τον υπορογόνο

➤ T4: ο όγκος διηθεί τον ορογόνο χιτώνα ή διηθεί παρακείμενες δομές

T4a: ο όγκος διηθεί τον υπορογόνο

➤ T4b: ο όγκος διηθεί παρακείμενες δομές

Παρακείμενες δομές θεωρούνται ο σπλήνας, το εγκάρσιο κόλον, το ήπαρ, το διάφραγμα, το πάγκρεας, το κοιλιακό τοίχωμα, τα επινεφρίδια, οι νεφροί, το λεπτό έντερο και οπισθοπεριτόναιο.

- Περιχικοί λεμφαδένες (N)

➤ NX: οι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν

➤ NO: καμία λεμφαδενική μετάσταση

➤ N1: μετάσταση σε 1 έως 2 λεμφαδένες

➤ N2: μετάσταση σε 3 έως 6 λεμφαδένες

➤ N3α: μεταστάσεις σε 7 έως 15 λεμφαδένες

➤ N3β: μεταστάσεις σε 16 και περισσότερους λεμφαδένες

- Απομακρυσμένη μετάσταση (M)

➤ MX: η παρουσία μετάστασης δεν μπορεί να εκτιμηθεί

➤ MO: καμία απομακρυσμένη μετάσταση

➤ M1: απομακρυσμένη μετάσταση

Η απομακρυσμένη μετάσταση περιλαμβάνει περιτοναϊκή εμφύτευση, θετικό κυτταρολογικά περιτόναιο και επιπλοϊκό όγκο που δεν αποτελεί τμήμα συνεχούς επέκτασης.

Σύμφωνα με τον παραπάνω καθορισμό του TNM τα στάδια του γαστρικού καρκίνου έχουν ως εξής:

Στάδιο	Ta	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T1	N1	M0
	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
<b>IIB</b>	T1	N2	M0
	T4a	N0	
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
<b>IIIA</b>	T1	N3	M0
	T4a	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
<b>IIIB</b>	T4b	N2	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N3a	M0
	T3	N3a	M0
	T1	N3b	M0
	T2	N3b	M0
<b>IIIC</b>	T4b	N3b	M0
	T4ab	N3a	M0
	T4a	N3b	M0
	T3	N3b	M0
<b>IV</b>	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

## 2.10 Ταξινόμηση εκτομής

Το σύστημα ταξινόμησης R (resection) υποδεικνύει το ποσοστό της υπολειμματικής νόσου που έχει απομείνει μετά από την χειρουργική εκτομή του όγκου. Το R0 δείχνει ότι δεν υπάρχει καθόλου μακροσκοπική ή μικροσκοπική υπολειμματική νόσος. Το R1 δείχνει μικροσκοπική υπολειμματική και το R2 μακροσκοπική υπολειμματική νόσο. Η ταξινόμηση R εμπλέκεται στην ατομική φροντίδα του ασθενούς και την κλινική έρευνα. Οι χειρουργοί θα έπρεπε να αναμένουν τα οριστικά παθολογοανατομικά αποτελέσματα πριν ολοκληρώσουν τις χειρουργικές αναφορές τους, έτσι ώστε το αρχείο των ασθενών να περιλαμβάνει την ταξινόμηση R για τη γαστρεκτομή. Τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών που περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση θα πρέπει να περιέχουν πληροφορίες για την κατάσταση του R.

### 3. Μηχανισμοί αγγειογένεσης στον καρκίνο γενικά

Τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του όγκου είναι ανεξάρτητα από τα αιμοφόρα αγγεία. Όταν ένας όγκος φτάσει περίπου στα 2mm<sup>3</sup> απαιτεί την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών όπως οι άλλοι ιστοί. Η ικανοποίηση των μεταβολικών αναγκών του όγκου συμβαίνει μέσω της νεοαγγειογένεσης η οποία αποκαλείται και αγγειογένεση όγκου. Ο πιο καλά χαρακτηρισμένος μηχανισμός σχηματισμού νέων αγγείων είναι η μέσω εκβλαστήσεων ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η διαδικασία τριών βημάτων αφορά διεύρυνση προϋπαρχόντων αγγείων και αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης καθώς και πολλαπλασιασμό και μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός το οποίο οδηγεί σε αποκατάσταση της συνέχειας των αγγείων. Τελικά, εναποτίθεται μια νέα αγγειακή βασική μεμβράνη και τα πολλαπλασιαζόμενα περικύτταρα στρατολογούνται για να σταθεροποιήσουν τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία. Άλλα παραδείγματα αγγειογένεσης όγκου είναι η αγγειογένεση εγκολεασμού και η σπειραματική. Αφού δεν απαιτείται στρατολόγηση ενδοθηλιακών κυττάρων, πολλαπλασιασμός και μετανάστευση, προχωρούν πιο γρήγορα και με χαμηλότερο ενεργειακό κόστος. Αυτοί οι τύποι αγγειογένεσης κυριαρχούν στους καρκίνους του παχέος εντέρου, του στομάχου, του θύμου και του δέρματος. Επιπλέον, οι όγκοι μπορούν επίσης να τραφούν από αγγεία ξενιστές ή σχηματίζοντας ψευδοαγγεία κατά τον μιμητισμό της αγγειογένεσης. Όλες οι διαδικασίες που προαναφέρθηκαν δεν είναι αποκλειστικές. Αντίθετα, σε πολλές περιπτώσεις συνδέονται στενά. Για το λόγο αυτό, οι αποτελεσματικές αντικαρκινικές θεραπείες δεν θα έπρεπε μόνο να επικεντρώνονται στην ελάττωση της δραστηριότητας των προαγγειογενετικών παραγόντων που στοχεύονται κατά την δημιουργία των αγγείων, αλλά να περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία αγγειακών παραγόντων.

#### 3.1 Αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση του γαστρικού καρκίνου

Ο ιστός του όγκου, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού καρκίνου, αποτελείται τόσο από κύτταρα του όγκου όσο και από κύτταρα του στρώματος. Η ανάπτυξη και η μετάσταση του όγκου καθορίζονται όχι μόνο από τα ίδια τα κύτταρα του όγκου αλλά και τα στρωματικά κύτταρα. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του όγκου και των ενεργοποιημένων στρωματικών κυττάρων δημιουργούν ένα μοναδικό μικροπεριβάλλον το οποίο είναι καθοριστικό για ανάπτυξη του όγκου και τη μετάστασή του. Το οργανο-ειδικό μικροπεριβάλλον μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη, την αγγειογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση των νεοπλασμάτων στον άνθρωπο.

Τόσο η αγγειογένεση όσο και η λεμφαγγειογένεση είναι σημαντικές για την ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου. Η αυξημένη αγγειοποίηση επάγει την ανάπτυξη πρωτοπαθών νεοπλασμάτων προμηθεύοντας με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και παρέχει μια οδό για αιματογενή μετάσταση. Οι Weidneretal πρώτοι ανέφεραν μια άμεση σχέση ανάμεσα στην επίπτωση της μετάστασης και τον αριθμό και την πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων στον διηθητικό καρκίνο του μαστού. Παρόμοιες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη σχέση στους καρκίνους του γαστρεντερικού σωλήνα. Η επαγωγή της αγγειογένεσης μεσολαβείται από μια ποικιλία μορίων που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του όγκου καθώς και από τα στρωματικά κύτταρα - ξενιστές. Η κλινική πρόγνωση εξαρτάται από το αν έχει συμβεί μετάσταση σε λεμφαδένες. Η ανάπτυξη των λεμφαγγείων (λεμφαγγειογένεση) στην περιφέρεια του όγκου σχετίζεται με μεταστάσεις του λεμφικού συστήματος στις περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου. Η λεμφαγγειογένεση ρυθμίζεται από μέλη της οικογένειας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και τους υποδοχείς τους.

## **3.2 Αγγειογένεση στο γαστρικό καρκίνο**

### **3.2.1 VEGF-A**

Τα κύτταρα του γαστρικού καρκίνου παράγουν ποικίλους αγγειογενετικούς παράγοντες. Από αυτούς, ο VEGF-A θεωρείται ένας από τους πιο ισχυρούς



υποκινητές της αγγειογένεσης στους όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα. Απελευθερώνεται από κύτταρα του καρκίνου. Οι ινοβλάστες και τα φλεγμονώδη κύτταρα στο στρώμα του όγκου αποτελούν επίσης πηγές του προερχόμενου από τους ξενιστές VEGF-A. Ο VEGF-A, γνωστός και ως παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας, είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που μπορεί, επιπρόσθετα, να παίζει έναν κεντρικό ρόλο στην υπερδιαπερατότητα των αγγείων. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει μια σχέση ανάμεσα στην έκφραση του VEGF-A και της πυκνότητας των μικροαγγείων στον ανθρώπινο γαστρικό καρκίνο. Οι όγκοι που είναι θετικοί στον VEGF-A έχουν πτωχότερη πρόγνωση από ότι οι αρνητικοί.

Η αγγειογένεση του γαστρικού καρκίνου φαίνεται να εξαρτάται από τον ιστολογικό τύπο. Ο εντερικού τύπου γαστρικός καρκίνος τείνει να μεθίσταται στο ήπαρ αιματογενώς. Αντίθετα, ο διάχυτου τύπου καρκίνος είναι πιο διηθητικός και η διασπορά είναι κυρίως περιτοναϊκή. Παράγοντες υπεύθυνοι για την μετάσταση στο ήπαρ και την περιτοναϊκή διασπορά δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα, παρά ταύτα όμως, έχει βρεθεί ότι ο αγγειογενετικός φαινότυπος διαφέρει ανάμεσα στο εντερικού και διάχυτου τύπου γαστρικούς καρκίνους. Σε σύγκριση με τον διάχυτου τύπου καρκίνο, ο εντερικού τύπου εξαρτάται σε μεγαλύτερο βαθμό από την αγγειογένεση. Οι εντερικού, αλλά όχι οι διάχυτου τύπου, όγκοι εκφράζουν υψηλά επίπεδα VEGF-A και το επίπεδο της έκφρασης αυτής σχετίζεται σημαντικά με το πλήθος των αγγείων. Αντίθετα, η έκφραση του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGF-2) είναι υψηλότερη σε διάχυτου τύπου όγκους, ιδίως σε σκιρρώδους τύπου όγκους. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο VEGF-A επάγει την αγγειογένεση και την εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου στον άνθρωπο, ιδίως του εντερικού τύπου.

Τα επίπεδα του VEGF-A στο περιφερικό αίμα, δηλαδή στον ορό και στο πλάσμα, έχουν εξεταστεί σε ασθενείς με κακοήθεις ασθένειες. Οι Ohtaetal εξέτασαν τα επίπεδα του VEGF-A στο περιφερικό αίμα και την φλέβα παροχέτευσης του όγκου και κατόπιν τα εκτίμησαν σε σχέση με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του γαστρικού καρκίνου. Βρήκαν ότι τα επίπεδα του VEGF-A στο πλάσμα ήταν

αυξημένα σε ασθενείς με διήθηση της φλέβας και ότι η αύξηση σχετίζεται με λεμφαδενική μετάσταση. Το επίπεδο του VEGF-A στο πλάσμα των περιφερικών φλεβών είναι ένας ευαίσθητος δείκτης για την πρόοδο του καρκίνου του στομάχου.

### 3.2.2. Ιντερλευκίνη 8 (IL-8)

Η IL-8 είναι μια πολυλειτουργική κυτοκίνη η οποία μπορεί να διεγείρει την διαίρεση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μπορεί να επάγει μετανάστευση μερικών κυττάρων του όγκου και έχει εμπλακεί στην επαγωγή της αγγειογένεσης σε ασθένειες όπως η ψωρίαση και η ρευματοειδής αρθρίτιδα καθώς και σε μερικές κακοήθειες ασθένειες. Η IL-8 αποτελεί έναν γνωστό αγγειογενετικό παράγοντα ο οποίος είναι παρών στον καρκίνο του πνεύμονα και παράγεται επίσης από τα μελανώματα και τους καρκίνους της κύστης και του προστάτη. Εξετάστηκε η έκφραση της IL-8 στον καρκίνο του στομάχου και βρέθηκε ότι οι περισσότεροι όγκοι εκφράζουν IL-8 σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά στον αντίστοιχο φυσιολογικό βλεννογόνο. Το επίπεδο του mRNA της IL-8 σε νεοπλάσματα σχετίζεται έντονα με αυξημένη αγγείωση, υποδεικνύοντας έτσι ότι η IL-8 που παράγεται από τα κύτταρα του όγκου ρυθμίζει την νεοαγγειογένεση. Για την παροχή αποδείξεων για τον συνήθη ρόλο της IL-8 στην αγγειογένεση και στην ογκογένεση του ανθρώπινου γαστρικού καρκίνου εισήχθησαν τα γονίδια της IL-8 σε αρκετές κυτταρικές σειρές ανθρώπινου γαστρικού καρκίνου. Γαστρικά καρκινικά κύτταρα επιμολυσμένα με το γονίδιο της IL-8 και εγχεόμενα ορθοτοπικά στο γαστρικό τοίχωμα ποντικών χωρίς θύμο αδένες παράγουν γρήγορα εξελισσόμενα, έντονα αγγειοβριθή νεοπλάσματα.

Τα γαστρικά καρκινικά κύτταρα δεν εκφράζουν μόνο την IL-8 αλλά και τον υποδοχέα A (CXCR1) και τον υποδοχέα B (CXCR2) της IL-8. Η in vitro επεξεργασία ανθρώπινων καρκινικών γαστρικών κυττάρων με εξωγενή IL-8 επάγει την έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), της μεταλλοπρωτεϊνάσης του στρώματος MMP-9, του VEGF-A και του mRNA της IL-8. Αντίθετα, τέτοια επεξεργασία ελαττώνει την έκφραση του mRNA της E-καδερίνης. Η επεξεργασία με IL-8 αυξάνει την διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων και

η έκφραση της IL-8 συνδέεται με την δραστηριότητα της MMP-9. Συνοπτικά, αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς για την IL-8 και ότι η IL-8 μπορεί να έχει αυτοκρινή/ παρακρινή ρόλο στην προοδευτική αύξηση του καρκίνου του στομάχου στον άνθρωπο.

Η πρόγνωση για ασθενείς με καρκίνο του στομάχου που εκφράζει σε υψηλά επίπεδα την IL-8 και τον VEGF-A είναι σημαντικά πτωχότερη από αυτή των ασθενών των οποίων οι όγκοι εκφράζουν τα παραπάνω σε χαμηλά επίπεδα. Ένα υψηλό επίπεδο IL-8 στην φλέβα παροχέτευσης του καρκίνου του στομάχου σχετίζεται έντονα με σχετικά μικρή ελεύθερης νόσου περίοδο επιβίωσης.

### **3.2.3. Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (PD-ECGF)**

Ο PD-ECGF, ένα μιτογόνο των ενδοθηλιακών κυττάρων, έχει χημειοτακτική δραστηριότητα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* και είναι αγγειογενετικό *in vivo*. Έχει βρεθεί ότι ο PD-ECGF είναι πανομοιότυπος με τη φωσφορυλάση της θυμιδίνης, ένα ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων της πυριμιδίνης. Η έκφραση του PD-ECGF αυξάνεται σε αρκετούς τύπους συμπαγών όγκων συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου. Έχει αναφερθεί ότι ο PD-ECGF σχετίζεται με αγγειογένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου στον άνθρωπο. Ο PD-ECGF εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε αγγειακούς όγκους οι οποίοι εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του VEGF-A. Σε τέτοιους καρκίνους του παχέος εντέρου, η κύρια πηγή PD-ECGF είναι τα διηθητικά κύτταρα. Στον καρκίνο του στομάχου ο PD-ECGF εκφράζεται πιο συχνά στα διηθητικά κύτταρα από ότι στο επιθήλιο του όγκου. Υπάρχει μια συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του PD-ECGF από τα διηθητικά κύτταρα, στην έκφραση του VEGF-A από το επιθήλιο του όγκου και στο πλήθος των αγγείων στον εντερικού αλλά όχι στον διάχυτου τύπο γαστρικό καρκίνο.

### 3.2.4. Αγγειοποιητίνη

Οι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας της αγγειοποιητίνης έχουν ταυτοποιηθεί ως μόρια πρόσδεσης για το Tie-2. Η αγγειοποιητίνη-1 ενεργοποιεί τον Tie-2, οδηγώντας σε αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα κατά την πρόσδεση, και διεγείρει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και συμβάλλει στη σταθεροποίηση των αιμοφόρων αγγείων με τη στρατολόγηση περικυττάρων. Η αγγειοποιητίνη-2 είναι ένας φυσικός ανταγωνιστής του υποδοχέα του Tie-2. Σαν τέτοιος, ανταγωνίζεται την ωρίμανση των αγγείων μέσω της αγγειοποιητίνης-1 και ρυθμίζει την ανάπτυξη, υποστροφή ή εκβλάστηση των αιμοφόρων αγγείων, βασιζόμενος στην παρουσία του VEGF. Οι VEGF-A και VEGFR2 κυρίως εμπλέκονται στην εκκίνηση της αγγειογένεσης, ενώ το σύστημα αγγειοποιητίνης/Tie-2 σχετίζεται με τον ανασχεδιασμό και την ωρίμανση των αγγείων. Η αγγειοποιητίνη-1 και -2 έχουν αναφερθεί ότι εκφράζονται έντονα στον καρκίνο του στομάχου στον άνθρωπο. Η αναστολή της αγγειοποιητίνης-1 από έναν φορέα μη έκφρασης έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνει την ογκογένεση και την αγγειογένεση στα αλλομοσχέματα γαστρικού καρκίνου στα αθυμικά ποντίκια. Η παραγωγή αγγειοποιητίνης-2 επίσης συμβάλλει στην αγγειογένεση του όγκου του γαστρικού καρκίνου με την παρουσία του VEGF μέσω της επαγωγής πρωτεασών των ενδοθηλιακών κυττάρων.

### 3.3 Λεμφαγγειογένεση όγκου στο γαστρικό καρκίνο

Η οικογένεια του VEGF περιλαμβάνει τους VEGF-A, -B, -C, -D, -E και -F και τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα (PlGF). Οι VEGF-C και VEGF-D προσδέονται στους VEGFR-3 και VEGFR-2. Ο VEGFR-3 είναι ένας υποδοχέας τυροσινικής κινάσης ο οποίος εκφράζεται κυρίως στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων.

Οι Skobeetal περιέγραψαν τον VEGF-C σαν ένα λεμφαγγειογενετικό παράγοντα ο οποίος μπορεί επιλεκτικά να επάγει υπερπλασία των λεμφαγγείων. Μια σημαντική σχέση ανάμεσα στη λεμφαδενική μετάσταση και στην έκφραση του VEGF-

C έχει αναφερθεί στον γαστρικό καρκίνο. Οι Onogawa et al εξέτασαν την έκφραση των VEGF-C και VEGF-D με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας σε 140 αρχαικά χειρουργικά δείγματα γαστρικού καρκίνου με υποβλεννογόνια διήθηση. Η ανοσοαντίδραση του VEGF-C συνδεόταν με λεμφική διήθηση και λεμφαδενική μετάσταση. Δεν υπήρξε καμία σύνδεση ανάμεσα στην ανοσοαντίδραση του VEGF-D και στα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο VEGF-C είναι ένας κυρίαρχος ρυθμιστής της λεμφαγγειογένεσης στα αρχικά στάδια του γαστρικού καρκίνου.

Οι υποδοχείς του VEGF εκφράζονται από μια μεγάλη ποικιλία σειρών καρκινικών κυττάρων. Ο VEGF-A και ο VEGFR-1/2 συνεκφράζονται σε έναν αριθμό καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων καρκίνων του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου και του παγκρέατος υποδεικνύοντας ότι ο VEGF-A άμεσα επηρεάζει την ανάπτυξη του όγκου μέσω ενός αυτοκρινούς μηχανισμού. Ο VEGFR-3 έχει επίσης ανιχνευθεί σε πολλούς τύπους κακοήθων κυττάρων, αν και η σημασία τέτοιας έκφρασης παραμένει ασαφής. Πρόσφατα εξετάστηκε η έκφραση και λειτουργία του VEGFR-3 σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. In vitro επεξεργασία της κυτταρικής σειράς KKLS, η οποία εκφράζει τον VEGFR-3, με τον σύνδεσμο αυτού του υποδοχέα, τον VEGF-C, προκάλεσε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένη έκφραση mRNA που κωδικοποιούν την κυκλίνη D1, τον PIGF και ένα παράγοντα αυτοκρινούς κινητικότητας. Έτσι, ο VEGF-C μπορεί να δρα τόσο με αυτοκρινή όσο και με παρακρινή τρόπο για να προωθεί την αγγειογένεση και περαιτέρω την ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου στον άνθρωπο.

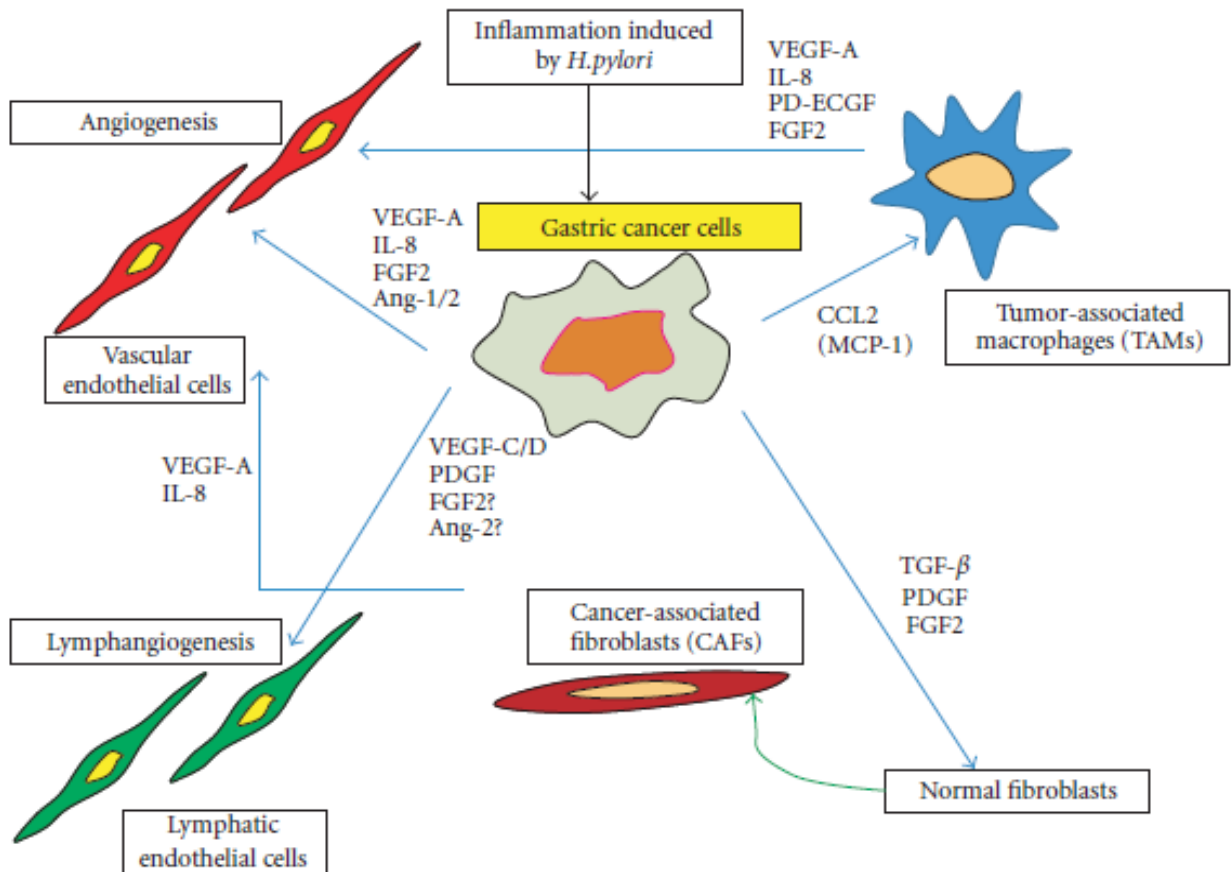
Άλλοι αυξητικοί παράγοντες που έχουν αναφερθεί ως λεμφαγγειογενετικοί είναι ο FGF-2 και ο PDGF-BB. Η λεμφαγγειογενετική επίδραση του FGF-2 φαίνεται να είναι έμμεση, δηλαδή συμβαίνει μέσω του VEGF-C ή -D. Πρόσφατα βρέθηκε ότι τα γαστρικά καρκινικά κύτταρα παράγουν PDGF-BB και ότι τα διατεταμένα λεμφαγγεία στην περιφέρεια του όγκου εκφράζουν τον υποδοχέα β του PDGF, υποδεικνύοντας ότι ο PDGF-BB αποτελεί ρυθμιστή της λεμφαγγειογένεσης στον καρκίνο του στομάχου. Η αγγειοποιητίνη-2 είναι σημαντική για την θεμελίωση της λεμφικής αγγειοποίησης. Η σηματοδότηση του VEGF-C/VEGFR-3 είναι ένα μονοπάτι

–κλειδί αρχικού πολλαπλασιασμού για τα λεμφαγγεία, ενώ η αγγειοποιητίνη-2 είναι σημαντική στα μετέπειτα στάδια μετασχηματισμού. Η σπουδαιότητα του FGF-2, του PDGF και της αγγειοποιητίνης-2 για τη λεμφική μετάσταση στον καρκίνο του στομάχου στον άνθρωπο είναι ακόμα άγνωστη.

### 3.4 Αλληλεπίδραση κυττάρων όγκου – στρώματος στην αγγειογένεση του όγκου

Το στρώμα του όγκου αποτελείται από ενεργοποιημένες ινοβλάστες (μυοϊνοβλάστες), λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων. Τα μακροφάγα που μεταναστεύουν στο στρώμα λέγονται σχετιζόμενα με τον όγκο μακροφάγα (tumor-associated macrophages – TAMs). Ο ρόλος των TAMs στην πρόοδο του όγκου είναι περίπλοκος. Αν και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα μπορεί να έχουν ογκοκατασταλτική δραστηριότητα, έχει αναφερθεί ότι τα κύτταρα του όγκου διαφεύγουν της δραστηριότητας αυτής. Είναι σαφές ότι τα TAMs είναι ενεργοί παίκτες στη διαδικασία της προόδου του όγκου και της διήθησης. Πράγματι, η απομάκρυνση των μακροφάγων λόγω γενετικών μεταλλάξεων έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Ένα σπουδαίο χαρακτηριστικό των μακροφάγων είναι ικανότητα για αγγειογενετική δραστηριότητα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν ποικίλους παράγοντες οι οποίοι επάγουν την αγγειογένεση στην επούλωση τραυμάτων και στις χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες. Κατά την ενεργοποίηση από τα καρκινικά κύτταρα, τα TAMs μπορούν να απελευθερώσουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες, πρωτεολυτικά ένζυμα και κυτοκίνες. Σε κλινικές μελέτες, ο υψηλός αριθμός των TAMs έχει δείχθει ότι σχετίζονται με υψηλή πυκνότητα αγγείων και πρόοδο όγκου. Έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι η διείσδυση των TAMs στον ιστό του όγκου σχετίζεται σημαντικά με την αγγείωση του όγκου στον καρκίνο του οισοφάγου και του στομάχου στον άνθρωπο. Η στρατολόγηση των μακροφάγων μεσολαβείται από έναν αριθμό χημειοτακτικών μορίων, όπως η MCP-1/CCL2 και η MIP-1a/CCL3. Έχει βρεθεί ότι η MCP-1 που παράγεται από τα κύτταρα του όγκου συνδέεται σημαντικά με διήθηση μακροφάγων και κακοήθη συμπεριφορά, όπως αγγειογένεση, διήθηση όγκου και

λεμφική διήθηση. Η επιμόλυνση γαστρικών κυττάρων μών με το γονίδιο της MCP-1 προκαλεί έντονη διείσδυση των μακροφάγων μέσα στον όγκο και επάγει ογκογένεση και δυνατότητα μετάστασης. Επειδή τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν VEGF-



Η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του γαστρικού καρκίνου και των στρωματικών κυττάρων επηρεάζει την αγγειογένεση και τη λεμφαγγειογένεση μέσω των ποικίλων αγγειογενετικών παραγόντων και κυτοκινών.

A, IL-8, FGF-2 και PD-ECGF η MCP-1 που εκφράζεται από τα γαστρικά καρκινικά κύτταρα παίζει ρόλο στην αγγειογένεση μέσω στρατολόγησης και ενεργοποίησης μακροφάγων.

Οι ενεργοποιημένες ινοβλάστες στο καρκινικό στρώμα είναι εξέχοντες ρυθμιστές της προόδου του όγκου και για το λόγο αυτό καλούνται σχετιζόμενες με τον καρκίνο ινοβλάστες (CAFs). Οι CAFs διαθέτουν προφίλ γονιδιακής έκφρασης που διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών ινοβλαστών και αποκτούν έναν τροποποιημένο φαινότυπο, παρόμοιο με αυτό των ινοβλαστών που σχετίζονται με την

επούλωση τραυμάτων. Ο ιστός του όγκου περιέχει άφθονους αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και πρωτεΐνες ανάπλασης του στρώματος. Για το λόγο αυτό, οι όγκοι συνδέονται με τραύματα που δεν επουλώνονται. Αν και οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των ινοβλαστών στους όγκους δεν είναι πλήρως κατανοητοί, οPDGF, οTGF-β και ο FGF-2 είναι γνωστό ότι εν μέρει έχουν ανάμειξη σε αυτό.

### **3.5 Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού διεγείρει την αγγειογένεση στο γαστρικό καρκίνο**

Μια τελευταία πρόοδος στην κατανόηση της παθογένεσης του γαστρικού καρκίνου είναι η αναγνώριση του ρόλου του ελικοβακτηριδίου στην γαστρική καρκινογένεση. Η λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στην παθογένεση της ατροφικής γαστρίτιδας, της εντερικής μετάπλασης και του πεπτικού έλκους. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για το γαστρικό καρκίνο και το 1994 ο ΠΟΥ κατέταξε αυτό το βακτήριο ως μείζον βιολογικό καρκινογόνο. Επιπρόσθετα, ο εμβολιασμός του στομάχου των γερβίλων της Μογγολίας με ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού έχει δείχθει ότι σχετίζεται με περιστατικά χρόνιας γαστρίτιδας, εντερικής μετάπλασης και αδενοκαρκινώματος. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το ελικοβακτηρίδιο διαπερνά το φυσιολογικό, το μεταπλαστικό και το νεοπλασματικό επιθήλιο για να προκαλέσει μια ισχυρή ανοσοφλεγμονώδη απάντηση και να υποκινήσει τη γαστρική καρκινογένεση. Το ελικοβακτηρίδιο είναι ένας πιθανός ενεργοποιητής του NF-kB στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του NF-kB από τη λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο επάγει μια ποικιλία κυτοκινών, αγγειογενετικών παραγόντων, μεταλλοπρωτεϊνών και μορίων προσκόλλησης. Η σχέση ανάμεσα στην λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο και την αγγειογένεση μελετάται εντατικά τα τελευταία χρόνια. Οι καρκινοπαθείς με λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο παρουσιάζουν μεγαλύτερη αγγειοβρίθεια όγκου από ότι οι καρκινοπαθείς μετά από



εκρίζωση του ελικοβακτηριδίου, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι η λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού επηρεάζει την αγγειογένεση του γαστρικού καρκίνου. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι τα cag-Αθετικά στελέχη του ελικοβακτηριδίου παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ιστού, στην αγγειογένεση, στη διήθηση του καρκίνου και στη μετάσταση. Οι Crabtreeetal αναφέρουν ότι η λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο επάγει την παραγωγή IL-8 από το γαστρικό επιθήλιο. Έχει βρεθεί ότι η καλλιέργεια γαστρικών καρκινικών κυττάρων μαζί με ελικοβακτηρίδιο επάγει την έκφραση mRNA που κωδικοποιούν την IL-8, τον VEGF-A, την αγγειογενίνη, τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης και την MMP-9 από τα γαστρικά καρκινικά κύτταρα.

## 4. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

### 4.1 Πολλαπλασιασμός φυσιολογικών κυττάρων

Οι μονοκύτταροι οργανισμοί, όπως τα βακτήρια και οι σακχαρομύκητες, αυξάνουν και διαιρούνται όσο ταχύτερα μπορούν. Η ταχύτητα με την οποία πολλαπλασιάζονται εξαρτάται κυρίως από την παρουσία θρεπτικών ουσιών στο περιβάλλον τους. Αντίθετα, τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού είναι εξειδικευμένα μέλη μιας πολύ οργανωμένης κοινότητας και ο πολλαπλασιασμός τους πρέπει να ελέγχεται ώστε ένα ορισμένο κύτταρο να διαιρείται μόνο όταν ο οργανισμός χρειάζεται ένα άλλο κύτταρο, είτε για να αυξηθεί είτε για να αναπληρώσει μια απώλεια. Επομένως, για να πολλαπλασιαστεί ένα κύτταρο δεν φτάνουν μόνο οι θρεπτικές ουσίες, αλλά χρειάζονται επιπλέον και διεγερτικά χημικά σήματα από άλλα κύτταρα, συνήθως τα γειτονικά. Τα σήματα αυτά χρησιμοποιούνται για να αρθούν οι περιορισμοί στην αύξηση του κυττάρου και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Σημαντικό παράδειγμα ενός τέτοιου περιοριστικού μηχανισμού, ο οποίος φυσιολογικά ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Η πρωτεΐνη αυτή ανακαλύφθηκε από τη μελέτη του ρετινοβλαστώματος, ενός σπάνιου οφθαλμικού όγκου των παιδιών, που χαρακτηρίζεται από έλλειψη ή δυσλειτουργία της πρωτεΐνης αυτής. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος αφθονεί στον πυρήνα όλων των κυττάρων των σπονδυλωτών. Προσδέεται σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες γονιδίων και τις εμποδίζει να διεγείρουν τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εξωκυττάρια σήματα, όπως οι αυξητικοί παράγοντες που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οδηγούν σε ενεργοποίηση των συμπλόκων G<sub>1</sub>-Cdkινασών. Τα σύμπλοκα αυτά φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και έτσι τροποποιούν τη διαμόρφωσή της. Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος ελευθερώνει τις προσδεδεμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες

μπορούν πλέον να ενεργοποιήσουν ανεμπόδιστα τα γονίδια που απαιτούνται για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τα διεγερτικά σήματα που μπορούν να ξεπεράσουν τους ανασταλτικούς μηχανισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι κυρίως πρωτεϊνικοί αυξητικοί παράγοντες. Αυτές οι εκκρινόμενες σηματοδοτικές πρωτεΐνες προσδένονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και ενεργοποιούν ενδοκυττάριας σηματοδοτικές οδούς που διεγείρουν την κυτταρική αύξηση και την κυτταρική διαίρεση. Οι περισσότεροι αυξητικοί παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηρισθεί από τις επιδράσεις τους σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε ιστική καλλιέργεια. Ένας από τους πρώτους αυξητικούς παράγοντες που ταυτοποιήθηκαν με αυτόν τον τρόπο ήταν ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (platelet-derived growth factor ή PDGF), του οποίου οι δράσεις είναι παρόμοιες με αυτές πολλών άλλων αυξητικών παραγόντων. Όταν πήζει το αίμα, για παράδειγμα σε ένα τραύμα, τα αιμοπετάλια που έχουν ενσωματωθεί στο θρόμβο εκλύουν PDGF. Ο PDGF προσδέεται σε υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης οι οποίοι εντοπίζονται στα επιζώντα κύτταρα στη θέση του τραύματος και τα διεγείρει να πολλαπλασιασθούν και να επουλώσουν το τραύμα. Παρομοίως, αν ένα τμήμα του ήπατος αφαιρεθεί σε μια εγχείρηση ή καταστραφεί από οξεία βλάβη, τα ηπατοκύτταρα αλλά και άλλα κύτταρα του σώματος παράγουν μια πρωτεΐνη γνωστή ως ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας, ο οποίος διεγείρει τα επιζώντα ηπατοκύτταρα σε πολλαπλασιασμό.

## 4.2 Πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων

Οι διάφορες μορφές του καρκίνου είναι προϊόντα μεταλλάξεων που αποδεδμεύουν το κύτταρο από τους συνήθεις μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής επιβίωσης. Ένα σωματικό κύτταρο μεταλλάσσεται με μια σειρά τυχαίων συμβάντων και αποκτά την ικανότητα να

πολλαπλασιάζεται χωρίς τους φυσιολογικούς περιορισμούς. Οι απόγονοί του κληρονομούν τις μεταλλάξεις και αναπτύσσουν έναν όγκο που μπορεί να αυξάνει απεριόριστα.

Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για τις διαταραχές ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα αφορούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες γονιδίων: τα γονίδια πολλαπλασιασμού, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που κανονικά προάγουν την κυτταρική διαίρεση, και τα γονίδια αντιπολλαπλασιασμού, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που κανονικά αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου.

Μια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο πολλαπλασιασμού η οποία προκαλεί υπέρμετρη αύξηση της παραγωγής ή της δράσης της αντίστοιχης πρωτεΐνης οδηγεί σε υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το μεταλλαγμένο γονίδιο ταξινομείται ως ογκογονίδιο, δηλαδή γονίδιο που προάγει τον καρκίνο, ενώ το φυσιολογικό ομόλογό του αποκαλείται πρωτο-ογκογονίδιο. Αντίστροφα, μια μετάλλαξη που αδρανοποιεί ένα γονίδιο αντιπολλαπλασιασμού μπορεί να απελευθερώσει ένα κύτταρο από τους φυσιολογικούς περιορισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και έτσι να οδηγήσει σε υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επομένως, τα γονίδια αντιπολλαπλασιασμού των φυσιολογικών κυττάρων αποκαλούνται ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σε ένα φυσιολογικό διπλοειδές κύτταρο υπάρχουν δύο αντίγραφα κάθε ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Για να χαθεί ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού πρέπει να χαθούν ή να αδρανοποιηθούν και τα δύο αντίγραφα του γονιδίου, εφόσον για τη φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου συνήθως επαρκεί έστω και ένα μόνο αντίγραφο. Αντίθετα, στην περίπτωση ενός πρωτο-ογκογονιδίου, για να προκύψει ένα ανάλογο αποτέλεσμα αρκεί να μεταλλαχθεί μόνο ένα αντίγραφο.

Υπάρχουν πολλά είδη πρωτο-ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων που κωδικοποιούν διαφορετικά είδη πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, ένα ογκογονίδιο μπορεί να δημιουργηθεί από οποιοδήποτε από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

των σηματοδοτικών διεργασιών οι οποίες εμπλέκονται στην απάντηση των κυττάρων στους αυξητικούς παράγοντες, μέσω μιας μετάλλαξης η οποία οδηγεί σε παραγωγή μιας πρωτεΐνης με ανώμαλη δράση. Η πρωτεΐνη πιθανόν έχει ανώμαλη δράση επειδή παράγεται: 1) από κύτταρα τα οποία κανονικά δεν την παράγουν, 2) σε υπερβολική ποσότητα ή 3) σε μια μορφή με ανεξέλεγκτη δράση. Τέτοια μεταλλαγμένα γονίδια μπορεί να προάγουν τον καρκίνο προκαλώντας κυτταρικό πολλαπλασιασμό ακόμα και όταν δεν υπάρχουν τα κατάλληλα εξωκυττάρια σήματα. Για παράδειγμα, ένα ογκογονίδιο παράγεται από το γονίδιο που κωδικοποιεί τον αυξητικό παράγοντα PDGF με μετάλλαξη της ρυθμιστικής αλληλουχίας που ελέγχει την έκφρασή του. Τα κύτταρα που φέρουν αυτό το ογκογονίδιο παράγουν απρόσφορα τη φυσιολογική πρωτεΐνη PDGF και αν επίσης εκφράζουν υποδοχείς για τον PDGF θα αυτό-διεγείρονται συνεχώς σε πολλαπλασιασμό. Άλλα ογκογονίδια κωδικοποιούν υπερδραστήριους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ή υπερδραστήριες ενδοκυττάριας σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Τα κύτταρα που εκφράζουν αυτά τα ογκογονίδια συμπεριφέρονται σαν να δέχονται συνεχώς σήματα για πολλαπλασιασμό. Παρομοίως, οι μεταλλάξεις που διαταράσσουν πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο προάγουν τον καρκίνο επιτρέποντας στο κύτταρο να επιβιώσει ακόμα και όταν απουσιάζουν τα κατάλληλα σήματα επιβίωσης.

### 4.3 Βιολογία κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η βιολογία της κυτταρικής διαίρεσης, διαφοροποίησης και απόπτωσης είναι ασυνήθιστα παρά τα αναμενόμενα όμοια στα φυσιολογικά και στα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά στο ότι παρεκτρέπεται η κυτταρική ρύθμιση. Τα καρκινικά κύτταρα περιέχουν όλα τα είδη των βιομορίων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τον κυτταρικό θάνατο και την έκφραση πολλών εξειδικευμένων για κάθε κύτταρο

λειτουργιών. Η αποτυχία της ρύθμισης αυτών των λειτουργιών έχει σαν αποτέλεσμα την παραλλαγή του φαινοτύπου και τον καρκίνο.

Τέσσερις είναι οι κυτταρικές λειτουργίες που οδηγούν σε μια ακατάλληλη ρύθμιση σε ένα νεόπλασμα. Πρώτον, η κανονική πίεση για τον συνήθη βιοχημικό έλεγχο πάνω στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι αναποτελεσματική. Δεύτερον, το πρόγραμμα διαφοροποίησης μπορεί να παρεκτραπεί. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να καθλωθούν σε ένα καθορισμένο σημείο της διαδικασίας διαφοροποίησης ή να διαφοροποιηθούν σε ακατάλληλο ή ανώμαλο κυτταρικό τύπο. Τρίτον, η χρωμοσωμική και γενετική οργάνωση μπορεί να αποδιοργανωθεί τόσο ώστε τα παραλλαγμένα κύτταρα να παράγονται με αυξημένη συχνότητα. Οι παραλλαγές των κυττάρων μπορεί να αυξήσουν την ενζυμική παραγωγή ή τις διαδικασίες οι οποίες επιτρέπουν την κακοήθη διήθηση και τις μεταστάσεις. Τέλος, το στεγανά ρυθμιζόμενο σύστημα της κυτταρικής απόπτωσης μπορεί να απορυθμιστεί.

Κατά βάση ο καρκίνος είναι μια πάθηση με συσσώρευση κλωνοποιημένων κυττάρων. Ανώμαλος κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι απαραίτητος αν και συχνά ανεπαρκής για την καρκινογένεση. Η αύξηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων, το καρκινικό φορτίο δηλαδή, σίγουρα αποτελεί αρνητικό και δυσμενές στοιχείο για τον ξενιστή. Στην πραγματικότητα, το σημαντικότερο σημείο το οποίο αποτελεί και σημαντικό εφαλτήριο για την θεραπεία κατά του καρκίνου είναι να μειωθεί ο καρκινικός κυτταρικός πληθυσμός και να προστατευθεί ο οργανισμός από περαιτέρω συσσώρευση καρκινικών κυττάρων.

Για να προσεγγίσουμε καλύτερα αυτό το σημείο είναι απαραίτητη μια πλήρης περιγραφή των μοναδικών χαρακτηριστικών του καρκινικού πολλαπλασιασμού. Αυτό δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι τόσο ο καρκινικός όσο και ο φυσιολογικός πολλαπλασιασμός είναι παρόμοιοι. Από την προοπτική μιας βιολογικής ανάπτυξης είναι προφανές ότι τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού, όπως ο άνθρωπος, έχουν ένα ουσιαστικό πολλαπλασιαστικό δυναμικό το οποίο είναι σε τεράστια

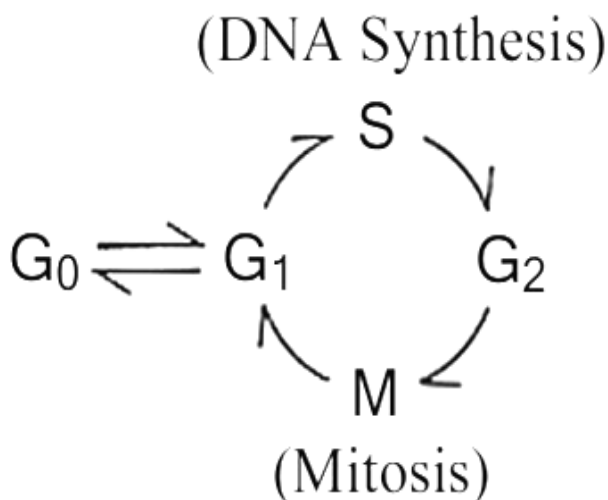
περίσσεια από αυτό που κανονικά απαιτείται για να καλύψει τις ενδεχόμενες ανάγκες μιας φυσιολογικής αύξησης και ανάπτυξης. Η κυτταρική ζωή εξελίσσεται από έναν μονοκύτταρο οργανισμό ο οποίος επιλέχθηκε για την ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται σε μικρό εύρος χρόνου χωρίς τον εξαναγκασμό που επιβάλλεται από τη βιοχημική πρόοδο της κυτταρικής διαίρεσης.

Τυπικά εργαστηριακά πειράματα σε βακτηρίδια έδειξαν ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί διαίρεση του κυττάρου σε χρόνο 20 λεπτών σε ιδανικές συνθήκες. Η ανάγκη της κυτταρικής διαίρεσης που επιβάλλεται σε πολυκύτταρους οργανισμούς είναι μεγαλύτερη αφού η αντιγραφή πρέπει να επιτελέσει εκτός από την απόλυτη πιστότητα και την διατήρηση της ακεραιότητας του οργανισμού.

Τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να διαιρούνται μια ή και δύο φορές την ημέρα *in vivo*. Ένα διαιρούμενο κύτταρο μια φορά την ημέρα θα μπορέσει να δημιουργήσει έναν αριθμό κυττάρων ίσο με το συνολικό αριθμό κυττάρων σε έναν ενήλικο ανθρώπινο οργανισμό σε λιγότερο από δύο μήνες. Είναι ξεκάθαρο επομένως ότι τα ανθρώπινα κύτταρα έχουν ως κληρονομιά το πλεόνασμα της πολλαπλασιαστικής ικανότητας από τα αρχέγονα προγονικά κύτταρα. Οι πολυκύτταροι οργανισμοί πρέπει να αναπτύσσουν μηχανισμούς έτσι ώστε να ανακτούν αυτή την πολλαπλασιαστική ικανότητα στον κατάλληλο χρόνο και στο κατάλληλο μέρος. Το κλειδί για την κατανόηση του καρκινικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι να χαρακτηρισθούν αυτοί οι μηχανισμοί και να γίνει αντιληπτό πού και πώς αυτοί αποτυγχάνουν κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης.

Το ποσοστό πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέσα σε οποιοδήποτε πληθυσμό εξαρτάται από τρεις παραμέτρους: 1) το ποσοστό της κυτταρικής διαίρεσης, 2) το μέρος των κυττάρων μέσα στον πληθυσμό που υποβάλλεται σε κυτταρική διαίρεση και 3) το ποσοστό απώλειας κυττάρων από τον πληθυσμό. Το ποσοστό της κυτταρικής διαίρεσης αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος κυτταρικής διαίρεσης.

Ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης μπορεί να διακριθεί σε δύο λειτουργικές φάσεις, τη φάση S και τη φάση M, και σε δύο προπαρασκευαστικές φάσεις, τη φάση G1 και τη φάση G2. Η φάση S ορίζεται ως η φάση κατά την οποία το DNA ξεδιπλώνεται. Σε κανονικές συνθήκες ο χρόνος που χρειάζεται ένα χαρακτηριστικό ανθρώπινο κύτταρο για την πλήρη φάση S είναι περίπου 8 ώρες και είναι αμετάβλητος. Τα πλήρως ξεδιπλωμένα χρωμοσώματα διαχωρίζονται σε κάθε έναν από τους δύο θυγατρικούς πυρήνες με τη διαδικασία της μίτωσης κατά τη διάρκεια της φάσης M. Η φάση M διαρκεί περίπου μια ώρα και σε κανονικές συνθήκες είναι και αυτός ο χρόνος αμετάβλητος. Η φάση G1 προηγείται της φάσης S, ενώ η φάση G2 προηγείται της φάσης M. Οι φάσεις G1 και G2 είναι απαραίτητες για τη σύνθεση των κυτταρικών συστατικών που απαιτούνται για την υποστήριξη των φάσεων που τις ακολουθούν και τελικά ολόκληρης της κυτταρικής διαίρεσης.



**G<sub>0</sub>**: Τα κύτταρα δεν έχουν μπει στον κυτταρικό κύκλο.

**G<sub>1</sub>**: Τα κύτταρα έχουν μπει σε φάση πολλαπλασιασμού αλλά το περιεχόμενο DNA σε αυτά είναι ίδιο με εκείνο της φάσης G<sub>0</sub>.

**S**: Τα κύτταρα συνθέτουν DNA. Το περιεχόμενο στα κύτταρα DNA είναι μεγαλύτερο εκείνου των φάσεων G<sub>0</sub> και G<sub>1</sub> και μικρότερο των φάσεων G<sub>2</sub> και M.

**G<sub>2</sub>**: Τα κύτταρα έχουν ολοκληρώσει τη σύνθεση DNA αλλά δεν έχουν μπει ακόμη στη φάση της μίτωσης. Το περιεχόμενο DNA στα κύτταρα είναι διπλάσιο εκείνου των φάσεων G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub>.

**M**: Ενεργώς διαιρούμενα κύτταρα. Το περιεχόμενο DNA είναι διπλάσιο της φάσης G<sub>1</sub>. Η φάση της μίτωσης είναι η βραχύτερη φάση του κύκλου.

#### 4.4 Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν γίνει για τον καθορισμό δεικτών και μεθόδων εκτίμησης της αυξητικής δραστηριότητας των νεοπλασμάτων, αφού σήμερα



είναι κοινώς παραδεκτό ότι ο ρυθμός ανάπτυξης ενός νεοπλασματος αντικατοπτρίζει τη βιολογική του συμπεριφορά.

Μετά την ολοκλήρωση της μίτωσης τα θυγατρικά κύτταρα εισέρχονται στη φάση G1 στην οποία παραμένουν για χρονικό διάστημα κυμαινόμενο ανάλογα με το είδος του ιστού. Στη συνέχεια τα κύτταρα προχωρούν στη φάση σύνθεσης του DNA κατά την οποία το γενετικό υλικό διπλασιάζεται. Ακολουθεί η φάση G2 πριν την επόμενη κυτταρική διαίρεση. Το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο μιτώσεων αποτελεί τον κυτταρικό κύκλο και η διάρκειά του ποικίλει εξαρτώμενη από τη διάρκεια της φάσης G1. Η φάση S είναι δείκτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μπορεί να εκτιμηθεί με τις εξής μεθόδους:

### **1. Σύνδεση θυμιδίνης**

Η εκτίμηση της σύνθεσης (φάση S του κυτταρικού κύκλου) με αυτοραδιογραφική μέθοδο, μετά από επώαση των ιστών με <sup>3</sup>H-θυμιδίνη αποτελεί καλά τεκμηριωμένη τεχνική με περιορισμένη εφαρμογή, λόγω του ότι απαιτείται νωπός βιώσιμος ιστός, σήμανση με ραδιενεργό τρίτιο της θυμιδίνης και αυτοραδιογραφικές τεχνικές.

### **2. Πρόσληψη βρωμοδεοξουριδίνης**

Η βρωμοδεοξουριδίνη είναι χημικό ανάλογο της πυριμιδίνης και ενσωματώνεται στο DNA των κυττάρων κατά τη φάση σύνθεσής του. Οι σημασμένοι με βρωμοδεοξουριδίνη πυρήνες αναδεικνύονται είτε ανοσοϊστοχημικά με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων είτε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

### **3. Μέτρηση του ποσού του DNA των κυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής**

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται δύο παράμετροι που πιστεύεται ότι επηρεάζουν την πρόγνωση των καρκινωμάτων, το περιεχόμενο του καρκινικού κυττάρου σε DNA και ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μέθοδο ποσοτικού υπολογισμού του περιεχομένου DNA στους πυρήνες των κυττάρων και ανάλυσης της κατανομής αυτού στον κυτταρικό κύκλο.

#### **4. Σύστημα ανάλυσης εικόνας**

Το σύστημα ανάλυσης εικόνας και η κυτταρομετρία ροής αποτελούν αναλυτικές μεθόδους με ευρεία εφαρμογή στην ογκολογία. Με τις μεθόδους αυτές υπολογίζεται το πυρηνικό DNA σε απόλυτες τιμές και σχετικές. Το σύστημα ανάλυσης εικόνας χρησιμεύει επίσης στην εκτίμηση του ποσοστού των νεοπλασματικών κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού με τη βοήθεια του μονοκλωνικού αντισώματος Ki-67 ή με το σύστημα της βρωμοδεοξουριδίνης. Επιπλέον, μπορεί να υπολογιστεί το ακριβές ποσοστό έκφρασης διαφόρων βιολογικών δεικτών και να μελετήσει τις μορφολογικές παραμέτρους κυττάρων και ιστών. Το τελευταίο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής την κάνει να υπερέχει από την κυτταρομετρία ροής.

#### **5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση αντιγόνων κυτταρικού πολλαπλασιασμού**

Τα αντιγόνα πολλαπλασιασμού εκφράζονται στον πυρήνα των κυττάρων σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ένα από τα περισσότερο μελετημένα αντιγόνα κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι το Ki-67. Το Ki-67 είναι μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει ένα πυρηνικό αντιγόνο που εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων εκτός από τη φάση G0. Η ανίχνευση του αντιγόνου επιτυγχάνεται σε νωπούς ιστούς και σε τομές παραφίνης με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Ο αριθμός των κυττάρων τα οποία εκφράζουν θετικότητα για το Ki-67 παριστά τον αριθμό των κυττάρων που

πολλαπλασιάζονται. Το Ki-67 ανιχνεύθηκε σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ανθρώπινους ιστούς και στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με ημιποσοτικό προσδιορισμό. Η έκφραση του Ki-67 αυξάνεται ανάλογα με το βαθμό της κακοήθειας και το στάδιο των καρκινωμάτων. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του Ki-67 αποτελεί εύχρηστο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εκτίμησης της επιθετικότητας των καρκινωμάτων.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας γίνεται μελέτη συγκεκριμένων αντιγόνων κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα αντιγόνα αυτά είναι το Ki-67, η τοποϊσομεράση IIa και οι πρωτεΐνες αντιγραφής A1, A2 και A3 και παρακάτω θα αναφέρονται και ως δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

## 5. Μελέτη δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67

### 5.1 Γενικά

Πρόκειται για μια ανθρώπινη πυρηνική πρωτεΐνη η έκφραση της οποίας είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην παθολογική ανατομική σαν δείκτης πολλαπλασιασμού για τη μέτρηση του κλάσματος ανάπτυξης των κυττάρων στους ανθρώπινους όγκους. Το Ki-67 ανιχνεύει μια διπλή ζώνη με εμφανή μοριακά βάρη των 395 και 345 kD σε ανοσοστυπώματα πρωτεϊνών από κύτταρα πολλαπλασιασμού. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο διαφορετικά σχηματισμένες ισομορφές mRNA με ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος των 9.768 και 8,688 βάσεων οι οποίες κωδικοποιούν αυτήν την σχετιζόμενη με τον πολλαπλασιασμό πρωτεΐνη με μοριακά βάρη που υπολογίζονται σε 358.761 D και 319.508D αντίστοιχα. Το κεντρικό μέρος του cDNA του αντιγόνου Ki-67 περιέχει ένα μεγάλο εξόνιο 6.845 βάσεων με 16 διαδοχικά επαναλαμβανόμενα στοιχεία των 366 βάσεων, τις Ki-67 επαναλήψεις, η κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει ένα υψηλά διατηρημένο μοτίβο 66 βάσεων, το Ki-67 μοτίβο, το οποίο κωδικοποιεί για τον επίτοπο που ανιχνεύεται από το Ki-67.

### 5.2 Εκτίμηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Ki-67 στον γαστρικό καρκίνο

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που αφορούν την έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67 σε ανθρώπινους όγκους. Συγκεκριμένα, σε ότι αφορά τον γαστρικό καρκίνο έχουν παρατηρηθεί τα παρακάτω.

Οι Oyaetalέχουν παρατηρήσει σημαντικά υψηλότερη έκφραση της Ki-67 σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Στη μελέτη των Czyzewskaetal οι 23 από τους 25 ασθενείς με λεμφαδενική ανάμειξη παρουσίασαν έκφραση του Ki-67 μεγαλύτερη από 20%.

Οι Muller et al έδειξαν μια συσχέτιση μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ταξινόμηση κατά Lauren. Τα καρκινώματα εντερικού τύπου έδειξαν μια στατιστικά σημαντική υψηλότερη έκφραση του Ki-67 από ότι τα καρκινώματα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου. Καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στην μελέτη ανάμεσα στην πολλαπλασιαστική δραστηριότητα και στο βάθος της διήθησης, στην ανάμειξη λεμφαδένων αλλά και στο βαθμό διαφοροποίησης.

Οι Xu et al έδειξαν μια σύνδεση ανάμεσα στην έκφραση του Ki-67 στο γαστρικό καρκίνο με περιτοναϊκές μεταστάσεις στο ήπαρ, στις ωθήκες και στα επινεφρίδια αλλά δεν υπήρχε καμία συσχέτιση ανάμεσα στον ιστολογικό τύπο, το βαθμό του μεγέθους του όγκου, το βάθος της διήθησης και την ανάμειξη λεμφαδένων.

Οι Yonemura et al περιέγραψαν ότι οι μεγάλοι όγκοι, με διάμετρο μεγαλύτερη των 6 εκατοστών, έδειξαν υψηλότερη έκφραση του Ki-67 από ότι αυτοί με διάμετρο μικρότερη των 6 εκατοστών. Παρόλα αυτά, δεν υπήρξε καμία σύνδεση ανάμεσα στην έκφραση του Ki-67 και στις περιτοναϊκές μεταστάσεις, στη διήθηση του ορογόνου χιτώνα ή το μακροσκοπικό τύπο.

Όλα αυτά τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών γενικά δείχνουν ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του Ki-67 ήταν συνδεδεμένα με κακοήθεις παραμέτρους των όγκων, όπως η λεμφαδενική ανάμειξη ή οι βαθμοί διαφοροποίησης στο γαστρικό καρκίνο.

## 6. Μελέτη δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού τοποϊσομεράση IIa

### 6.1 Γενικά

Η DNAτοποϊσομεράση IIa είναι ένα ένζυμο το οποίο στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο TOP2A. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια DNAτοποϊσομεράση, ένα ένζυμο που ελέγχει και τροποποιεί την τοπολογική κατάσταση του DNA κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Αυτό το πυρηνικό ένζυμο εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, ο διαχωρισμός των χρωματίδων και η ανακούφιση από το περιστροφικό στρες που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μεταγραφής και της αντιγραφής του DNA. Καταλύει τον παροδική ρήξη και την συνένωση των δύο αλυσίδων του διπλού DNAγεγονός το οποίο επιτρέπει στις αλυσίδες να περνούν η μια μέσα από την άλλη, αλλάζοντας έτσι την τοπολογία του DNA. Υπάρχουν δύο μορφές αυτού του ενζύμου σαν πιθανά προϊόντα ενός γεγονότος γονιδιακού διπλασιασμού. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραπάνω μορφή, το α, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και το β εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3.

Ο έλεγχος της τοπολογίας του DNAστα ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιείται από ένζυμα τα οποία ονομάζονται τοποϊσομεράσες (τύποι I και II) και είναι απαραίτητος για έναν αριθμό κυτταρικών διαδικασιών, όπως η μεταγραφή, η αντιγραφή του DNA, ο ανασυνδυασμός και η οργάνωση της χρωματίνης. Το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής δραστηριότητας της τοποϊσομεράσης τύπου II είναι αφιερωμένο στην λύση, με έναν ATP-εξαρτώμενο τρόπο, τοπολογικών συμπλεγμάτων (κόμβοι και αλυσίδες) τα οποία παραμένουν στο DNAμετά την αντιγραφή. Αυτό απαιτεί το πέρασμα μιας άθικτης έλικας μέσα από μια παροδική ρήξη της διπλής αλυσίδας που η τοποϊσομεράση II παράγει σε μια ξεχωριστή έλικα. Αντίθετα, τα ένζυμα του τύπου I, τα οποία επάγουν παροδικές ρήξεις στη μια αλυσίδα της διπλής έλικας και δεν χρησιμοποιούν ATP, πραγματοποιούν μόνο την χαλάρωση της υπερελικώδους στροφής. Οι ρόλοι της τοποϊσομεράσης II στην συμπύκνωση και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων που προηγούνται της μίτωσης μπορεί, παρόλα αυτά, να είναι έμμεσοι και επικουρικοί στην αποκατάσταση της τοπολογίας. Τα θηλαστικά έχουν τουλάχιστον δύο ισομορφές της τοποϊσομεράσης II που καλούνται α



και β. Η ισομορφή α, η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου, παραμένει η καλύτερα χαρακτηρισμένη από τις δύο. Εκτός από μια ενζυμική λειτουργία, η τοποϊσομεράση IIa μπορεί επίσης να παίζει έναν δομικό ρόλο στην οργάνωση της χρωματίνης μεσολαβώντας την προσκόλληση των βρόγχων χρωματίνης σε πρωτεϊνικά πλαίσια κατά τη διάρκεια της μεσόφασης και της μίτωσης.

Στα κύτταρα που βρίσκονται σε διαίρεση τα επίπεδα της τοποϊσομεράσης IIa αυξάνονται σταθερά σε όλη τη φάση S φτάνοντας στο μέγιστο σημείο κατά τη διάρκεια των G2/M σταδίων. Κατά τη διάρκεια της φάσης G2, όπου η δραστηριότητα περάσματος αλυσίδων της τοποϊσομεράσης IIa είναι μέγιστη, τα κύτταρα πρέπει να περάσουν από μια απαλυσίδωση- ευαίσθητο σημείο ελέγχου πριν από τη μίτωση. Παρά τον καλά καθορισμένο ρόλο της κατά τη φάση G2, παραμένει ασαφές το πόσο σχετική είναι η δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης IIa κατά τη φάση S και το εάν exerted επιλεκτικά στο αντιγραφόμενο DNA. Ίσως αντικατοπτρίζοντας πολυπλοκότητες στην ρύθμιση της δραστηριότητας της τοποϊσομεράσης IIa η ενδοκυττάρια εντόπιση της πρωτεΐνης είναι έντονη σε όλο τον κυτταρικό κύκλο. Παρόλα αυτά, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τις μεταβλητές που ελέγχουν την υποκυτταρική διανομή της τοποϊσομεράσης IIa και με το βαθμό κατά τον οποίο τα σημεία συσσώρευσης σχετίζονται με αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα.

Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η τοποϊσομεράση IIa αλληλεπιδρά άμεσα με τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) 1 και 2 καθώς και με την RNA πολυμεράση II, αυξάνοντας την ενδιαφέρουσα πιθανότητα το φάσμα των δραστηριοτήτων της τοποϊσομεράσης IIa να είναι ευρύτερο από ότι αρχικά είχε γίνει αντιληπτό.

Κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου των τοποϊσομερασών τύπου II, σχηματίζονται παροδικά ομοιοπολικά διασπασμένα με την τοποϊσομεράση II ενδιάμεσα προϊόντα DNA, καλούμενα συμπλέγματα διάσπασης ή εύσχιστα συμπλέγματα, τα οποία μπορούν να σταθεροποιηθούν με τη χρήση φαρμάκων στοχευμένων στο ένζυμο.

Πράγματι, η τοποϊσομεράση IIa έχει στοχευθεί από πολλά αντικαρκινικά φάρμακα και αποτελεί, για το λόγο αυτό, το αντικείμενο έντονης βιοϊατρικής έρευνας.

Μερικά από αυτά τα φάρμακα που ονομάζονται δηλητήρια, όπως η ετοποσίδη, σταθεροποιούν συμπλέγματα διάσπασης. Άλλα φάρμακα που ονομάζονται αναστολείς, όπως οι διδιοξοπιπεραζίνες της ομάδας ICRF, έχουν ανάμειξη στην καταλυτική δραστηριότητα χωρίς να έχουν καμία επίδραση στη σταθεροποίηση εύσχιστων συμπλεγμάτων. Σε αντίθεση με τα δηλητήρια, οι αναστολείς δεν επάγουν βλάβες του DNA. Και οι δύο τύποι των φαρμάκων έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε κυτταρικά συστήματα θηλαστικών για να διαφωτίσουν βασικές όψεις της βιολογίας της τοποϊσομεράσης II. Πράγματι, η επιλεκτική παγίδευση της καταλυτικά ενεργής τοποϊσομεράσης IIa πάνω στο DNA από φάρμακα στοχευμένα στο ένζυμο έχει παράσχει τη βάση των βιοχημικών εργασιών οι οποίες επιτρέπουν είτε την ποσοτικοποίηση της δραστηριότητάς της σε σχέση το πέρασμα των αλυσίδων είτε την υψηλής ανάλυσης χαρτογράφηση των θέσεων διάσπασής της στο DNA.

## **6.2 Εκτίμηση της έκφρασης της τοποϊσομεράσης IIa στο γαστρικό καρκίνο**

Οι Wang et al ερεύνησαν την έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa και τη σχέση της με κλινικοπαθολογικοανατομικές παραμέτρους σε ασθενείς με πρωτοπαθή γαστρικό καρκίνο. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι τα ακόλουθα.

Υψηλή έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa παρατηρήθηκε στο 30% των πρωτοπαθών όγκων, στο 25% των λεμφαδενικών μεταστάσεων και στο 0,5% του μη νεοπλασματικού γαστρικού βλεννογόνου.

Η έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα σχετιζόταν θετικά με την εντόπιση του όγκου, με τον εντερικό ιστολογικό τύπο, με την έναρξη του γαστρικού αδενοκαρκινώματος σε μεγάλη ηλικία και με το ανδρικό φύλο. Δεν υπήρχε καμία άλλη συσχέτιση με άλλους κλινικοπαθολογικοανατομικές παραμέτρους. Δεν παρατηρήθηκε καμία σχέση ανάμεσα στην έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa και την επιβίωση.

Οι Yabuki et al μελέτησαν την έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa στις γαστρικές διαταραχές ταυτόχρονα με την έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67 σε αυτές παρατηρώντας τα ακόλουθα.

Η έκφραση της Ki-67 και η έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa σχετίζονταν σημαντικά τόσο στο μη νεοπλασματικό βλεννογόνο όσο και στο αδένωμα και το καρκίνωμα. Επιπρόσθετα, η έκφραση της Ki-67 ήταν σημαντικά υψηλότερη από την έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa. Εξέταση σειριακών τομών επίσης αποκάλυψε ότι τα θετικά στην τοποϊσομεράση κύτταρα ήταν σχεδόν πάντα θετικά και στο Ki-67 στους μη παθολογικούς και στους παθολογικούς ιστούς αλλά όχι και το αντίστροφο. Επιπλέον, στη ζώνη πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών γαστρικών αδένων η περιοχή των Ki-67 θετικών κυττάρων ήταν πολύ πιο ευρεία από αυτή της τοποϊσομεράσης. Η έκφραση της τοποϊσομεράσης στα αδενώματα και στα καρκινώματα τόσο του εντερικού όσο και του διάχυτου τύπου ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή στο μη νεοπλασματικό γαστρικό βλεννογόνο, γεγονός το οποίο εναρμονίζεται με προηγούμενα ευρήματα πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας σε ανθρώπινα γαστρικά νεοπλάσματα καθορισμένα από ανοσοϊστοχημικό έλεγχο της Ki-67.

Μεταξύ των γαστρικών νεοπλασμάτων, η έκφραση της τοποϊσομεράσης στο διάχυτου τύπου αδενοκαρκίνωμα ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή στο αδένωμα ή στο εντερικού τύπου αδενοκαρκίνωμα. Δεν υπήρχαν, παρόλα αυτά, σημαντικές διαφορές στην έκφραση της τοποϊσομεράσης ανάμεσα στο αδένωμα και στο εντερικού τύπου αδενοκαρκίνωμα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και με την Ki-67.

Η έκφραση της τοποϊσομεράσης και της Ki-67 στο γαστρικό αδένωμα ή καρκίνωμα εξείχε σημαντικά από την αντίστοιχη στο μη νεοπλασματικό γαστρικό βλεννογόνο. Μεταξύ των νεοπλασματικών αλλοιώσεων, ο διάχυτος τύπος είχε μια σημαντικά υψηλότερη έκφραση σε τοποϊσομεράση και Ki-67 αλλά δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην αντίστοιχη έκφραση ανάμεσα στα αδενώματα και στα εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφέρει οι Fogtetal.

Επιπρόσθετα, αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής δύο παραμέτρων αποκάλυψαν ότι στα κύτταρα Jurkat η έκφραση της τοποϊσομεράσης II παρατηρήθηκε σε κύτταρα σε φάσεις άλλες από την S και τις G2/M.

Οι Heck et al υπέδειξαν ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής της τοποϊσομεράσης II είναι πολύ μικρότερος στα φυσιολογικά κύτταρα από ότι στα εξαλλαγέντα λεμφοβλαστικά κύτταρα, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει την εμφάνιση των τοποϊσομεράση II-θετικών κυττάρων στη G1 φάση του κύκλου στη κυτταρική σειρά του Jurkat.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η υψηλότερη έκφραση της τοποϊσομεράσης II στα κακοήθη κύτταρα αντικατοπτρίζει όχι μόνο την αυξημένη δραστηριότητα πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων αλλά επίσης την ποιοτική μεταβολή της έκφρασης της τοποϊσομεράσης II σχετιζόμενη με κακοήθη εξαλλαγή.

Το περιεχόμενο των κυττάρων των όγκων σε τοποϊσομεράση II θεωρείται ως καθοριστικός παράγοντας για την τοξική δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων ή για την ευαισθησία /αντοχή διαφόρων ανθρώπινων όγκων σε φάρμακα. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει το επίπεδο δραστηριότητας της τοποϊσομεράσης II με την ανταπόκριση σε φάρμακα στοχευμένα σε αυτήν σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Επιπλέον, όχι μόνο οι ποσοτικές αλλά και οι ποιοτικές μεταβολές της τοποϊσομεράσης II στον ανθρώπινο καρκίνο μπορεί να σχετίζεται με την ευαισθησία ή την αντοχή των στοχευμένων σε αυτήν αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών εκδόχων. Επομένως, ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης της τοποϊσομεράσης II στις ανθρώπινες κακοήθειες μπορεί να προβλέψει ευαισθησία ή αντοχή στα στοχευμένα σε αυτήν χημειοθεραπευτικά έκδοχα.

## 7. Μελέτη των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού RPA1, RPA2 και RPA3 (πρωτεΐνες αντιγραφής A1, A2 και A3)

### 7.1 Γενικά

Η πρωτεΐνη αντιγραφής A (Replication Protein A – RPA) είναι μια πρωτεΐνη η οποία προσδένεται σε μονόκλωνο DNA και η οποία είναι απαραίτητη σε ποικίλες διαδικασίες του μεταβολισμού του DNA, δηλαδή στην αντιγραφή του, στον ανασυνδυασμό του, στα σημεία ελέγχου βλαβών του και σε όλους τους σημαντικούς τύπους των μηχανισμών επιδιόρθωσής του. Πρόκειται για ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από 3 υπομονάδες που καλούνται RPA1 (70kd), RPA2 (34kd) και RPA3 (14kd) και οι οποίες περιέχουν χαρακτηριστικές ολιγοσακχαριδικές / ολιγονουκλεοτιδικές προσδένουσες περιοχές αναδίπλωσης. Η RPA περιέχει 6 τέτοιες περιοχές, κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από 5 β-αλυσίδες τοποθετημένες σε ένα β-βαρέλι (β- κύλινδρο), μια δομή συνηθισμένη ανάμεσα στις πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA. Υπάρχουν 4 περιοχές μέσα στην υπομονάδα RPA1 που ορίζονται ως DNA-προσδένουσα περιοχή A (DNA-binding Domain A- DBD-A), DBD-B, DBD-C και DBD-F, ενώ οι άλλες 2 υπομονάδες περιλαμβάνουν μόνο μια περιοχή, την DBD-D για την RPA2 και την DBD-E για την RPA3. Παρόλα αυτά, μόνο η RPA1 και η RPA2 προσδένονται άμεσα στο μονόκλωνο DNA χρησιμοποιώντας 4 από τις 6 παραπάνω περιγεγραμμένες περιοχές αναδίπλωσης (DBD-A, DBD-B, DBD-C και DBD-D) με ένα διαδοχικό τρόπο. Σε αντίθεση με την καλή γνώση για τις ιδιότητες πρόσδεσης στο μονόκλωνο DNA των δυο μεγαλύτερων υπομονάδων της RPA, οι μοριακές λειτουργίες της μικρότερης υπομονάδας RPA3 είναι σχεδόν άγνωστες. Φαίνεται, παρόλα αυτά, ότι χρειάζεται για την επιβίωση πολλών τύπων βλάβης DNA οι οποίοι προκαλούν αναστολή ή κατάρρευση των πληθυσμών αντιγραφής.

Πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο της φωσφορυλίωσης των RPA1 και RPA2 για την επίτευξη της κυτταρικής αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA. Έχει δειχθεί ότι το N-τελικό άκρο της RPA2 φωσφορυλιώνεται από την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 2 (CDK2) οικογένεια των κινασών κατά τη διάρκεια των φάσεων S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Η ιονίζουσα ακτινοβολία επάγει την

υπερφωσφορυλίωση της RPA2 σε μια κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος (MO59J) πιθανώς μέσω του προϊόντος του γονιδίου της αταξίας - τελαγγειεκτασίας. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η υπερφωσφορυλίωση της RPA2 σε ανταπόκριση στη βλάβη του μιτωτικού DNA διευκολύνει την είσοδο του κύκλου στην G1 φάση και αυξάνει την κυτταρική βιωσιμότητα.

## **7.2 Εκτίμηση της έκφρασης των πρωτεϊνών αντιγραφής A1, A2 και A3 στο γαστρικό καρκίνο**

### **7.2.1 Εισαγωγή**

Η πρωτεΐνη αντιγραφής A (RPA) είναι το κύριο σύμπλεγμα πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα (15). Η RPA είναι απαραίτητη σε όλα τα σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια του DNA, συμπεριλαμβανομένης της αντιγραφής, της επιδιόρθωσης και του ανασυνδυασμού του DNA, της προαγωγής του κυτταρικού κύκλου καθώς και της απόκρισης του DNA σε βλάβες, παίζοντας το ρόλο του αισθητήρα στα πολλαπλά μονοπάτια ελέγχου βλαβών του DNA (15-19). Η RPA είναι απαραίτητη για κάθε ένα από τα τέσσερα κύρια μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA: την επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων, την επιδιόρθωση με εκτομή βάσεων, την επιδιόρθωση με αναντιστοιχία και την επιδιόρθωση με θραύση της διπλής έλικας του DNA (15). Η ανθρώπινη RPA είναι παρούσα στα κύτταρα σαν ένα ετεροτριμερές σύμπλεγμα αποτελούμενο από τρεις υπομονάδες οι οποίες, με φθίνουσα σειρά μεγέθους, έχουν οριστεί ως RPA1 (70 kDa), RPA2 (32 kDa) και RPA3 (14kDa) (20-22). Έχουμε πρόσφατα δείξει ότι η έκφραση της RPA είναι αυξημένη σε ανθρώπινους όγκους, όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, στον καρκίνο των ωοθηκών και στους αστροκυτταρικούς όγκους (23-26). Άλλοι ερευνητές έχουν επίσης δείξει αύξηση της RPA σε καρκινώματα οισοφάγου, μαστού, ρινοφάρυγγα και σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα (27-28).

Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν πολύ περιορισμένα δεδομένα που να αφορούν το γαστρικό καρκίνο. Τελευταία, έχει δειχθεί ότι η εξαναγκασμένη υπερέκφραση του miR-30a στην κυτταρική σειρά SGC7901R του γαστρικού καρκίνου ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εμποδίζοντας την αντιγραφή του DNA και ενισχύοντας την κατάτμηση του DNA. Είναι ενδιαφέρον το ότι ο στόχος του miR-30a ταυτοποιήθηκε ως η πρωτεΐνη αντιγραφής RPA1 υποδεικνύοντας ότι η αξιοποίηση της αντιγραφής του DNA μέσω της RPA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στόχος για θεραπεία του καρκίνου (29). Υπάρχει μια προηγούμενη μελέτη η οποία ερευνά την έκφραση της τρίτης υπομονάδας της RPA, της RPA3, στον ανθρώπινο γαστρικό καρκίνο και η οποία αναφέρει ότι η αύξηση της RPA3 εμπλέκεται στις ογκογενετικές ιδιότητες των κυττάρων του γαστρικού καρκίνου (30). Παρ'όλα αυτά, καμία προηγούμενη μελέτη δεν έχει διερευνήσει και τις τρεις υπομονάδες της RPA στο γαστρικό καρκίνο.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει την ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών RPA1, RPA2 και RPA3 σε μια σειρά 74 περιστατικών εξαιρεθέντος γαστρικού καρκίνου. Επιπλέον, η έκφραση των RPA1, RPA2 και RPA3 αναλύθηκε σε σχέση με συμβατικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (ηλικία, φύλο, βαθμός διαφοροποίησης, λεμφαδενική κατάσταση, λεμφαγγειακή διήθηση και στάδιο διήθησης), με τον δείκτη ki-67, με την έκφραση της τοποϊσομεράσης IIa και με την επιβίωση των ασθενών.

### **7.2.2 Μέθοδοι - Ασθενείς**

Αυτή είναι μια αναδρομική μελέτη 74 ασθενών οι οποίοι παρουσίασαν πρωτοπαθή γαστρικό καρκίνωμα και για τους οποίους κύβοι παραφίνης και κλινικές πληροφορίες ήταν διαθέσιμα. Πρόκειται για 51 άνδρες και 23 γυναίκες με ένα μέσο όρο ηλικίας τα 69 έτη (εύρος: 35-91 έτη). Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία πριν την εγχείρηση. Σύμφωνα με την 8<sup>η</sup> έκδοση του συστήματος σταδιοποίησης του καρκίνου που έχει υιοθετηθεί από την Κοινή Αμερικανική Επιτροπή Καρκίνου και τη Διεθνή

Ένωση κατά του Καρκίνου, οι όγκοι έχουν ταξινομηθεί ως στάδιο I: 10 περιπτώσεις, στάδιο II: 13 περιπτώσεις, στάδιο III: 49 περιπτώσεις και ως στάδιο IV: 2 περιπτώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις αποδόθηκε ένας ιστολογικός βαθμός σύμφωνα με την κατά WHO ταξινόμηση των γαστρικών καρκινωμάτων του 2010. Έτσι, υπήρχαν 21 χαμηλόβαθμα και 53 υψηλόβαθμα καρκινώματα. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης των ασθενών μετεγχειρητικά ήταν 60 μήνες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, καταγράφηκαν 10 θάνατοι σχετιζόμενοι με την ασθένεια.

### 7.2.3 Επεξεργασία δειγμάτων και ανοσοϊστοχημεία

Οι ιστοί αμέσως μετά την εξαίρεσή τους μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% και εγκλείστηκαν σε κερι παραφίνης ώστε να δημιουργηθούν κύβοι παραφίνης. Σειριακές τομές των 4μm από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλακίδια (superfrostplus) τα οποία, με τη σειρά τους, τοποθετήθηκαν σε κλίβανο των 37°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας ώστε να αποξηραθούν. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των RPA1, RPA2 και RPA3 πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης της στρεπταβιδίνης χρησιμοποιώντας τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-RPA1 (υπομονάδα P70, NA13, ογκογονίδιο), αντι-RPA2 (υπομονάδα P32, NA18, ογκογονίδιο) και αντι-RPA3 (υπομονάδα P14, κλώνος 1F4, Abnova) σε αραιώση 1:50 για κάθε αντίσωμα. Για να επιταθεί η αντιγονική αποκάλυψη οι τομές υποβλήθηκαν σε μικροκυματική επεξεργασία (με τη χρήση 1 MmEDTArH 8.0). Για τους αρνητικούς μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός αιγός αντί για το βασικό αντίσωμα στους 4 °C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας πριν από τη διαδικασία της χρώσης. Η χρώση για όλα τα αντισώματα εκτιμήθηκε τυφλά (δηλ. χωρίς καμία γνώση των κλινικών δεδομένων) από δυο παρατηρητές. Όποτε προέκυπτε μια διαφορά μεγαλύτερη του 5% ανάμεσα στους δυο εκτιμητές, τα πλακίδια επιθεωρούνταν από κοινού ώστε να επιτευχθεί μια συμφωνία. Πυρήνες από περίπου 1000 κύτταρα του όγκου από συστηματικά τυχαιοποιημένα οπτικά



πεδία (x40) από ολόκληρη την τομή μετρήθηκαν και ο δείκτης σήμανσης υπολογίστηκε ως το ποσοστό των σημασμένων πυρήνων που καταμετρήθηκαν στο συνολικό αριθμό των καρκινικών κυττάρων που καταμετρήθηκαν. Όλη η σαφώς αναγνωρίσιμη πυρηνική χρώση, εκτός από το φόντο (background), καταγράφηκε ως θετική για τις RPA1, RPA2 και RPA3. Δεν συμπεριλήφθηκαν καθόλου λεμφικά κύτταρα στις μετρήσεις, αν και εξέφρασαν τις RPA1, RPA2 και RPA3.

#### 7.2.4 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των κατανομών εξετάστηκε με το τεστ Kolmogorov – Smirnov. Το τεστ  $\chi^2$  του Pearson με διόρθωση συνέχειας και το τεστ Anova χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθούν οι υπό διερεύνηση πιθανοί συσχετισμοί ανάμεσα στις εκφράσεις των RPA1, RPA2 και RPA3 και τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Η προγνωστική επίδραση διαφόρων παραμέτρων (δηλ. η ηλικία, το φύλο, ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός κακοήθειας, οι λεμφαδένες, η λεμφαγγειακή διήθηση, το στάδιο της ασθένειας, η έκφραση των πρωτεϊνών RPA1, RPA2, RPA3, ki-67 και τοποϊσομεράσης IIa) στο κλινικό αποτέλεσμα (δηλ. θάνατοι από την ασθένεια) εξετάστηκε σχεδιάζοντας τις καμπύλες επιβίωσης σύμφωνα με τη μέθοδο Kaplan-Meier και συγκρίνοντας ομάδες με τη χρήση του logrank τεστ καθώς και μέσω της πολυπαραγοντικής ανάλυσης με τη χρήση του μοντέλου παλινδρόμησης Cox. Οι ασθενείς που απεβίωσαν από άλλα αίτια κατά την περίοδο παρακολούθησης χρησιμοποιήθηκαν ως censored δεδομένα. Προς αποφυγή οποιασδήποτε κατευθυνόμενης από τα δεδομένα κατηγοριοποίησης εισάγονταν συνεχείς μεταβλητές στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του SPSS για το λογισμικό των Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Τιμή του P μικρότερη ή ίση του 0.05 θεωρήθηκε ενδεικτική μιας στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

## 7.2.5 Αποτελέσματα

Πυρηνική ανοσοαντίδραση των πρωτεϊνών RPA1, RPA2 και RPA3 παρατηρήθηκε σε όλα τα υπό εξέταση καρκινώματα. Οι δείκτες σήμανσης των RPA1, RPA2 και RPA3 κυμάνθηκαν από 2% έως 85% για τις RPA1 και RPA3 και από 2% έως 90% για την RPA2 με μέσο όρο 40%, 50% και 40% για τις RPA1, RPA2 και RPA3 αντίστοιχα. Το μοτίβο της χρώσης ήταν κυρίως πυρηνικό, αν και ισχνή κυτταροπλασματική χρώση παρατηρήθηκε σε κάποιες περιπτώσεις η οποία θεωρήθηκε ως μη ειδική (Σχ.1). Η πυρηνική χρώση ήταν από έντονη έως μέτρια σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις που διερευνήθηκαν. Επιπλέον, πυρηνική ανοσοαντίδραση των RPA1, RPA2 και RPA3 παρατηρήθηκε σε φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο παρακείμενο στα καρκινώματα σε όλες τις υπό εξέταση περιπτώσεις. Στο φυσιολογικό βλεννογόνο τα θετικά κύτταρα ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένα και δεν εμφανίζονταν σε ομάδες.

Διαπιστώθηκε, επίσης, ανοσοχρώση για τις πρωτεΐνες ki-67 και τοποϊσομεράση IIΑ σε όλα τα καρκινώματα, με εύρος από 5% έως 90% για κάθε πρωτεΐνη (μέσος όρος 45% και 40% αντίστοιχα). Οι εκφράσεις των ki-67 και τοποϊσομεράσης IIΑ ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο παρακείμενο φυσιολογικό επιθήλιο συγκρινόμενες με τα καρκινώματα.

Έντονοι θετικοί συσχετισμοί ανέκυψαν με τη χρήση του τεστ συσχέτισης Pearson ανάμεσα στην έκφραση των RPA1 και RPA2 ( $p = 0.002$ ), των RPA1 και RPA3 ( $p < 0.0001$ ) και των RPA2 και RPA3 ( $p < 0.0001$ ). Μια σημαντική, επίσης, συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της έκφρασης της ki-67 και της τοποϊσομεράσης IIΑ ( $p < 0.0001$ ). Δεν βρέθηκαν καθόλου σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των RPA και στην έκφραση της ki-67 ή στην έκφραση της τοποϊσομεράσης IIΑ, όταν αναλύθηκαν στο σύνολο. Παρόλα αυτά, κατά τη διερεύνηση αυτών των συσχετισμών στάδιο προς στάδιο, ανέκυψαν σημαντικοί συσχετισμοί στα στάδια I καρκινώματα ανάμεσα στην έκφραση της RPA2 και της τοποϊσομεράσης IIΑ ( $p = 0.05$ ) καθώς επίσης και ανάμεσα στην έκφραση της RPA3 και της τοποϊσομεράσης IIΑ ( $p = 0.04$ ). Καμιά σημαντική σχέση δεν

διαπιστώθηκε ανάμεσα στην έκφραση της RPA1 ή της RPA3 και της τοποϊσομεράσης IIa ούτε ανάμεσα στην έκφραση των RPA και της ki-67.

Αναλύοντας τη σχέση ανάμεσα στην έκφραση των RPA1, RPA2 και RPA3 και στις διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, με τη χρήση του τεστ Ανονα, διαπιστώθηκε μια στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στο δείκτη σήμανσης της RPA2 και του ιστολογικού βαθμού ( $p=0.05$ ) κατά την οποία τα υψηλόβαθμα καρκινώματα επέδειξαν χαμηλότερη έκφραση της RPA2 από ότι τα χαμηλόβαθμα καρκινώματα (Σχ.2). Καμία σημαντική συσχέτιση δεν προέκυψε ανάμεσα στις πρωτεΐνες και στον ιστολογικό τύπο (σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Lauren ή κατά WHO).

Μια βαθμιαία μείωση στο δείκτη σήμανσης της RPA2 παρατηρήθηκε στα καρκινώματα σταδίου I έως τα σταδίου IV και αυτή η σχέση ήταν στατιστικής σημασίας (Σχ. 2).

Οι ενδείξεις σήμανσης των, RPA2 και RPA3 ήταν σημαντικά υψηλότερες στα καρκινώματα σταδίου I και II σε σύγκριση με αυτά των σταδίων III και IV ( $p =0.006$ ,  $p =0.01$  και  $p =0.002$  αντίστοιχα), (Σχ. 3).

Αναλύοντας τις σχέσεις ανάμεσα στις RPA πρωτεΐνες και στους παράγοντες σταδιοποίησης (T και N), βρήκαμε ότι η έκφραση των RPA1, RPA2 και RPA3 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς χωρίς λεμφαδενική μετάσταση (N0) σε σύγκριση με ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες (N1, N2 και N3), ( $p =0.019$ ,  $p =0.013$  και  $p =0.05$  αντίστοιχα, Σχ. 4). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια βαθμιαία ελάττωση του δείκτη σήμανσης της RPA2 από τους ασθενείς με N0 σε αυτούς με N3 ( $p =0.033$ ), (Σχ. 2). Ένας σημαντικά χαμηλότερος δείκτης σήμανσης του RPA3 καταγράφηκε σε περιστατικά με λεμφαγγειακή διήθηση ( $p =0.048$ ), (Σχ.5). Καμία συσχέτιση με την κατηγορία T δεν επιβεβαιώθηκε.

Στην μονοπαραγοντική ανάλυση της επιβίωσης, η κατάσταση των λεμφαδένων [LogRank (Mantel- Cox):  $p=0.026$ ,  $x^2 :4.962$ ,  $df:1$ ] και το στάδιο της ασθένειας [LogRank (Mantel- Cox):  $p=0.047$ ,  $x^2 :3.934$ ,  $df:1$ ] έδειξαν

στατιστικά σημαντικούς συσχετισμούς με την επιβίωση των ασθενών (Σχ. 6). Στην ομάδα των ασθενών με καρκινώματα σταδίων III και IV, στην ομάδα των ασθενών με διηθημένους λεμφαδένες (N1 – N3) και στην ομάδα των ασθενών με υψηλόβαθμα καρκινώματα, βρήκαμε σημαντικούς συσχετισμούς ανάμεσα στο δείκτη σήμανσης της RPA1 όταν είναι μεγαλύτερος του 40% και στην συνολικά καλύτερη επιβίωση [LogRank (Mantel- Cox) με  $p=0.05$ ,  $p=0.05$  και  $p=0.014$  αντίστοιχα], (Σχ. 7). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση του συνόλου παρατηρήθηκαν σημαντικοί συσχετισμοί ανάμεσα στην επιβίωση και την κατάσταση των λεμφαδένων και την RPA1 ( $p=0.025$ ), (Πιν. 1).

### 7.2.6 Συμπεράσματα

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά την ανοσοϊστοχημική έκφραση και των τριών υπομονάδων της πρωτεΐνης αντιγραφής RPA στο γαστρικό καρκίνο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, οι πρωτεΐνες RPA1, RPA2 και RPA3 επέδειξαν μια γενικευμένη πυρηνική έκφραση στα γαστρικά καρκινώματα, σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματά μας σε άλλους τύπους ανθρώπινου καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστης, των ωοθηκών και των αστροκυττωμάτων. Επιπλέον, και οι τρεις υπομονάδες εκφράστηκαν στον παρακείμενο, φαινομενικά, φυσιολογικό βλεννογόνο σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας που αφορούν τις RPA1 και RPA2 σε φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο παρακείμενο σε καρκινώματα. Η γενικευμένη έκφραση των RPA πρωτεϊνών σε φυσιολογικό φαινομενικά βλεννογόνο αντανακλά το ρόλο αυτών των πρωτεϊνών υπό φυσιολογικές συνθήκες στη ρύθμιση της αντιγραφής του DNA ή σαν μέρος του γενωμικού μηχανισμού επιδιόρθωσης. Βλέποντας τα παραπάνω, η γενικευμένη παρουσία των RPA πρωτεϊνών στα καρκινικά κύτταρα υποδεικνύει ότι η έκφρασή τους δεν χάνεται κατά τη διάρκεια της κακοήθους μετάλλαξης. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι RPA πρωτεΐνες έχουν κάποιο ρόλο να παίζουν στα κακοήθη κύτταρα, αν και πιθανώς όχι τον ίδιο με αυτόν στα φυσιολογικά κύτταρα.

Μια από τις πολλές διαφορές ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα είναι το μέγεθος του στρες αντιγραφής που συμβαίνει κατά την αντιγραφή. Τα καρκινικά κύτταρα με ενεργοποιημένα ογκογονίδια προκαλούν αυξημένα επίπεδα αντιγραφικού στρες (31). Το αντιγραφικό στρες φαίνεται να είναι μοναδικό στα καρκινικά κύτταρα αφού σπάνια παρατηρείται στα φυσιολογικά κύτταρα ακόμα και όταν πολλαπλασιάζονται ραγδαία (31). Έχει δειχθεί ότι η αναστολή των RPA πρωτεϊνών αυξάνει το στρες αντιγραφής και περιορίζει το μέγεθος του όγκου (32). Αυτό θα μπορούσε να αποδώσει ένα ρόλο στις RPA πρωτεΐνες στα καρκινικά κύτταρα και να εξηγήσει τη γενικευμένη έκφρασή τους στο γαστρικό αλλά και σε άλλους καρκίνους. Με άλλα λόγια, φαίνεται λογικό το ότι οι πρωτεΐνες RPA διευκολύνουν την ανάπτυξη του όγκου βοηθώντας τα καρκινικά κύτταρα να ανταπεξέλθουν στο αντιγραφικό στρες.

Από την άποψη των αυξανόμενων επιπέδων αντιγραφικού στρες στα καρκινικά κύτταρα και του καταγεγραμμένου ρόλου των RPA πρωτεϊνών στη μείωση αυτού του στρες, θα ήταν πιθανώς αναμενόμενη μια αυξανόμενη ανάγκη για RPA πρωτεΐνες στα καρκινώματα με υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού. Παρ' όλα αυτά, στη μελέτη μας, καμιά σημαντική σχέση δεν προέκυψε ανάμεσα στις RPA πρωτεΐνες και στον δείκτη πολλαπλασιασμού ki-67. Αυτό το εύρημα έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί στα καρκινώματα των ωοθηκών (25). Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουμε δει μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των RPA1 και RPA2 και της κυκλίνης D1(10). Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι στα κύτταρα των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων, η RPA1 επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο μέσω του μονοπατιού CDK4/Κυκλίνης-D (33). Η έκφραση του CDK4/Κυκλίνης-D βοηθά το κύτταρο να ανταπεξέλθει στον περιορισμό μεταξύ των φάσεων G1 και S. Έτσι, η RPA1 προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με υπερλειτουργία του μονοπατιού CDK4/Κυκλίνης-D, επισημαίνοντας ότι η RPA1 λειτουργεί για να οδηγήσει περισσότερα κύτταρα του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στις φάσεις S και G2 (33). Έχει δειχθεί ότι στα γαστρικά καρκινώματα οι κυκλίνες τύπου D φτάνουν στα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και σχηματίζουν λειτουργικά συμπλέγματα με

την CDK4 κατά το μέσο της φάσης G1(34). Από την άλλη πλευρά, έχει πρόσφατα υποδειχθεί ότι η ki-67 είναι ένας διαβαθμισμένος παρά ένας δυαδικός δείκτης τόσο για την προαγωγή του κυτταρικού κύκλου όσο και για τον χρόνο από την είσοδο στην ηρεμία (35). Ο Miller και συν αναφέρουν ότι συσσώρευση της ki-67 συμβαίνει μόνο κατά τις φάσεις S, G2 και M και ελαττώνεται συνεχώς στις φάσεις G0 και G1, άσχετα με την αιτία εισόδου στη φάση G0/ηρεμίας. Συνεπώς, τα επίπεδα της ki-67 κατά τις φάσεις G0 και G1 σε μεμονωμένα κύτταρα έχουν υψηλή ετερογένεια και εξαρτώνται από το πόσο διάστημα ένα μεμονωμένο κύτταρο έχει παραμείνει στη φάση G0 (35). Οι παραπάνω παρατηρήσεις θα μπορούσαν πιθανώς να εξηγήσουν την απουσία σημαντικών συσχετισμών ανάμεσα στην έκφραση των RPA και της ki-67.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν οι συσχετισμοί ανάμεσα στις εκφράσεις των RPA και στις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, όπως ο βαθμός, η λεμφαγγειακή διήθηση, η κατάσταση των λεμφαδένων και το στάδιο της νόσου. Παρόμοιοι συσχετισμοί έχουν καταγραφεί προηγούμενα σε καρκινώματα της ουροδόχου κύστης, υποδεικνύοντας ότι η σωστή λειτουργία του μηχανισμού των RPA σε αυτούς τους όγκους μπορεί να διατηρηθεί στους καλύτερα διαφοροποιημένους και στους λιγότερο προχωρημένους όγκους (24). Παρόλα αυτά, αυτό είναι ένα θέμα που απαιτεί περισσότερη μελέτη για να αποσαφηνιστεί, αφού αυτοί οι συσχετισμοί μπορεί να εξαρτώνται από το όργανο ή τον τύπο του καρκίνου καθώς, για παράδειγμα, η μελέτη μας σε καρκινώματα του παχέος εντέρου αποκάλυψε παράλληλους συσχετισμούς με το βαθμό και/ή το στάδιο του όγκου. Η ανάλυση επιβίωσης που πραγματοποιήσαμε υπέδειξε υψηλότερη έκφραση της RPA1 σχετιζόταν σημαντικά με συνολικά καλύτερη επιβίωση στην ομάδα των ασθενών με λεμφαδενική μετάσταση ή με προχωρημένο στάδιο νόσου. Αυτό το εύρημα θα μπορούσε να υπονοήσει μια πιθανή προγνωστική αξία της RPA1 με σεβασμό στη χημειοθεραπεία που δίδεται σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες και προχωρημένο στάδιο. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης η RPA1 διατήρησε τη σημασία της παράλληλα με την κατάσταση των λεμφαδένων.

Ένας περιορισμός της μελέτης μας, όπως συμβαίνει με τις περισσότερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες, είναι η ανικανότητα να διακρίνουμε τη λειτουργική κατάσταση των ανοσοϊστοχημικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Δεν είναι βέβαιο ότι η ανοσοϊστοχημικά ανιχνεύσιμη πρωτεΐνη είναι λειτουργικά ακέραιη. Η RPA υπερφωσφορυλιώνεται σε βλάβη του DNA ή σε αντιγραφικό στρες από τις κινάσες των σημείων ελέγχου συμπεριλαμβανομένης της ATM (ataxiatangiectasiamutated), της ATR (ATM and Rad3-related) και της DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), (36). Η υπερφωσφορυλίωση μπορεί να μεταβάλλει τις λειτουργίες της RPA και, επομένως, τις δραστηριότητες των μεμονωμένων μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται (36). Υπάρχουν ενισχυόμενες ενδείξεις ότι η υπερφωσφορυλίωση μεταβάλλει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των RPA και του DNA καθώς και μεταξύ των RPA και των πρωτεϊνών (36). Εκτός από τη φωσφορυλίωση, εκτεταμένη γενετική ανάλυση της ομόλογης πρωτεΐνης του ζυμομύκητα, της RFA1, έχει δείξει ότι βιώσιμες μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο παρουσιάζουν ελαττώματα στην επιδιόρθωση του DNA, στον ανασυνδυασμό και στους αυξημένους ρυθμούς χρωμοσωμικών αναδιαρρυθμίσεων και μεταλλάξεων (37). Στα θηλαστικά, η L221P μετάλλαξη της RPA1 προκαλεί ένα ελάττωμα στην πρόσδεση του μονόκλωνου DNA και ένα μη λειτουργικό σύμπλεγμα, προκαλώντας μια αύξηση στα επίπεδα βλάβης του DNA καθώς και στην συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου (38). Το αν οι παρατηρούμενες στη μελέτη μας πρωτεΐνες είναι υπερφωσφορυλιωμένες, μεταλλαγμένες, λειτουργικές ή όχι και το αν τα ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης στους λιγότερο διαφοροποιημένους και στους πιο προχωρημένους όγκους είναι συνέπεια μεταλλάξεων ή άλλων γεγονότων που σχετίζονται με την πρόοδο του καρκίνου, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Από την άλλη πλευρά, η γενικευμένη παρουσία των RPA πρωτεϊνών στο γαστρικό καρκίνο παρέχει έναν πιθανό στόχο για θεραπευτική παρέμβαση. Έχειδειχθεί ότι οι RPA πρωτεΐνες εμπλέκονται στο μονοπάτι ATR/Chk1 το οποίο είναι ένα κρίσιμο δίκτυο επιτήρησης το οποίο διατηρεί την γενομική ακεραιότητα κατά την αντιγραφή του DNA σταθεροποιώντας τις διχάλες αντιγραφής κατά τη φυσιολογική αντιγραφή ώστε να αποφευχθεί το αντιγραφικό στρες (32). Αυτό

δημιουργεί μια αυξημένη εξάρτηση από το μονοπάτι ATR/Chk1 στα καρκινικά κύτταρα(18). Οι Glanzeretal έχουν ταυτοποιήσει μια νέα πρωτεΐνη που ονομάζεται HAMNOη οποία αναστέλλει τις RPA μέσω επιλεκτικής πρόσδεσης στην αμινο-τελική περιοχή της RPA 70 και αναστέλλοντας τόσο την αυτοφωσφορυλίωση της ATRόσο και τη φωσφορυλίωση της RPA 32ser33 από την ATR (18). Σύμφωνα με τους Glanzer et al, η θεραπεία με HAMNO δημιουργεί αντιγραφικό στρες σε καρκινικά κύτταρα τα οποία ήδη υπόκεινται σε αυτό, αλλά όχι σε φυσιολογικά κύτταρα, και δρα συνεργικά με την ετοποσίδη για να εξοντώσει τα καρκινικά κύτταρα invitro και να καθυστερήσει την ανάπτυξη του όγκου in vivo (32). Επομένως, η HAMNOσκιαγραφεί το πώς οι αναστολείς των RPA αντιπροσωπεύουν υποψήφιες θεραπευτικές μεθόδους για τη θεραπεία του καρκίνου, παρέχοντας επιλεκτικότητα νόσου στα καρκινικά κύτταρα μέσω στόχευσης στην διαφορική τους απόκριση στο αντιγραφικό στρες (32). Κάποιος θα μπορούσε να αξιώσει ότι η στοχευμένη αναστολή των RPA πρωτεϊνών θα μπορούσε να δημιουργήσει μια ευκαιρία για να καταστρέψουμε κατά προτίμηση τα καρκινικά κύτταρα αναστέλλοντας αυτό το μονοπάτι. Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη που εξερευνούσε το ρόλο των RPA στα κύτταρα του γαστρικού καρκίνου, οκατευνασμός της RPA1 προκάλεσε τη δέσμευση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και προήγαγε την κυτταρική απόπτωση ρυθμίζοντας το πρωτεϊνικό επίπεδο της κασπάσης 3 (39). Η παρατηρηθείσα στη μελέτη μας προς τα άνω ρύθμιση της έκφρασης των RPA στο γαστρικό καρκίνο θα μπορούσε, επομένως, να παρέχει μια ευκαιρία για στοχευμένη παρέμβαση.

Συμπερασματικά, στη μελέτη μας έχουμε επιδείξει για πρώτη φορά τη γενικευμένη εξάπλωση της έκφρασης και των τριών υπομονάδων των RPA πρωτεϊνών στο γαστρικό καρκίνο. Αυτή η έκφραση φαίνεται να είναι πιο άφθονη σε χαμηλόβαθμους όγκους χωρίς λεμφαδενική μετάσταση και σε πρώιμα στάδια της νόσου. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να αποσαφηνίσουν τη λειτουργική κατάσταση των RPA στα γαστρικά καρκινώματα στο βαθμό που έχει υποδειχθεί ότι οι RPA επηρεάζουν τη χημειοαντοχή (40, 41). Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι σε όγκους ωοθηκών, η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με



σισπλατίνη ενισχύεται από μεταλλάξεις που αποδυναμώνουν την πρόσδεση των RPA στο DNA και ότι η διαμόρφωση των επιπέδων της RPA πρωτεΐνης είναι σημαντικά καθοριστική της χημειοαντοχής μέσω πολλαπλών μηχανισμών (41, 42). Υπό αυτές τις παρατηρήσεις, και όπως συμβαίνει με άλλους δείκτες που σχετίζονται με ευνοϊκούς προγνώστες οι οποίοι δρουν ταυτόχρονα ως προγνωστικοί παράγοντες (για παράδειγμα οι ορμονικοί υποδοχείς στον καρκίνο του μαστού) η προγνωστική αξία της RPA χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση καθώς η έκφραση της RPA θα μπορούσε να προσφέρει μια ευκαιρία για στοχευμένη αναστολή. Δεν υπάρχει καμία σύγκρουση συμφερόντων τα οποία θα μπορούσαν να γίνουν αντιληπτά ώστε να προκαταλάβουν αυτή τη δουλειά, ούτε οικονομική υποστήριξη ούτε άλλες προσωπικές διασυνδέσεις.

ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:  
 «ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ»  
 Μελέτη των πρωτεϊνών RPA1, RPA2, RPA3, Ki67 & TopoIIa – Κλινικοπαθολογοανατομικές συσχετίσεις

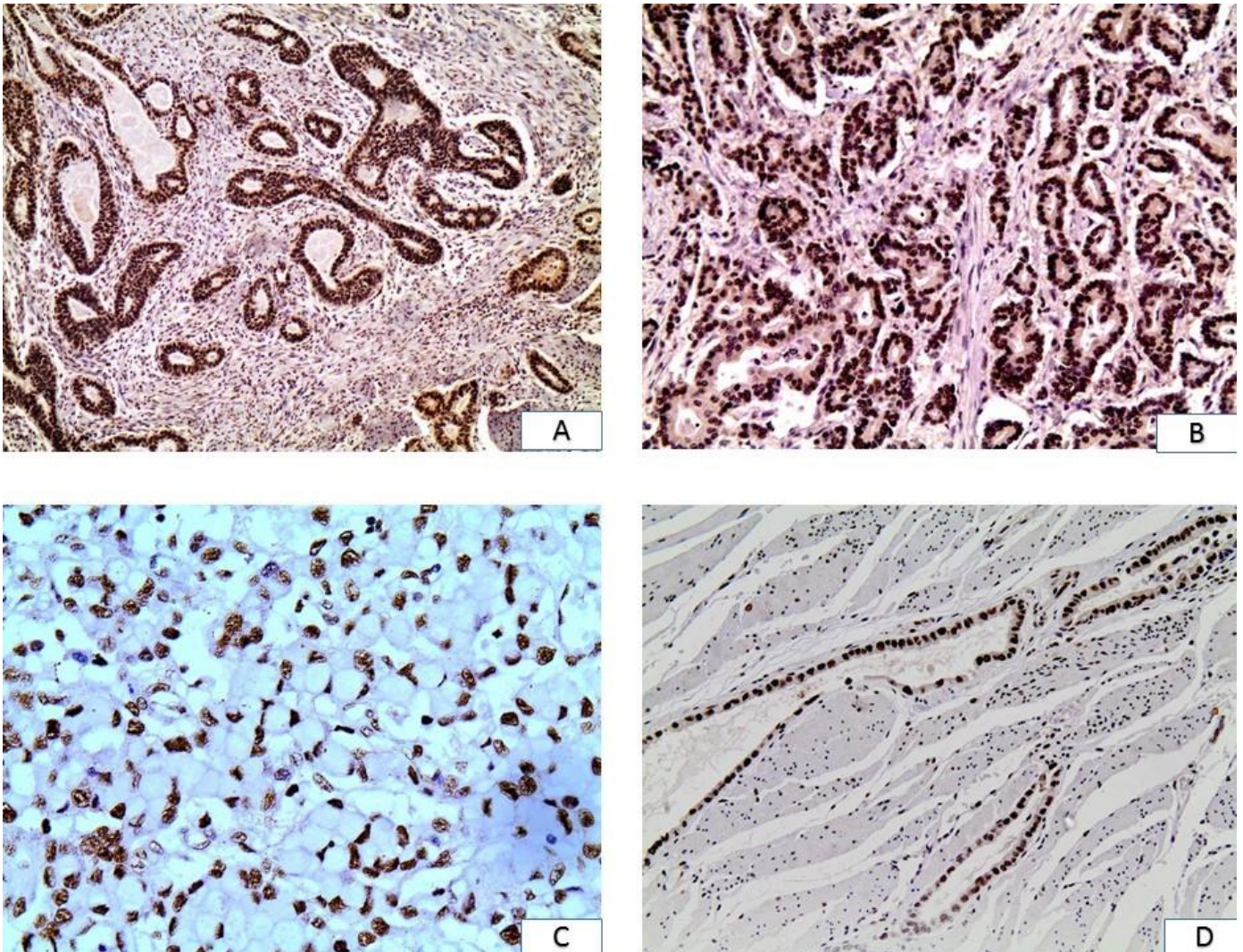
---

## Πίνακας 1.

## COX Regression

## Variables in the Equation

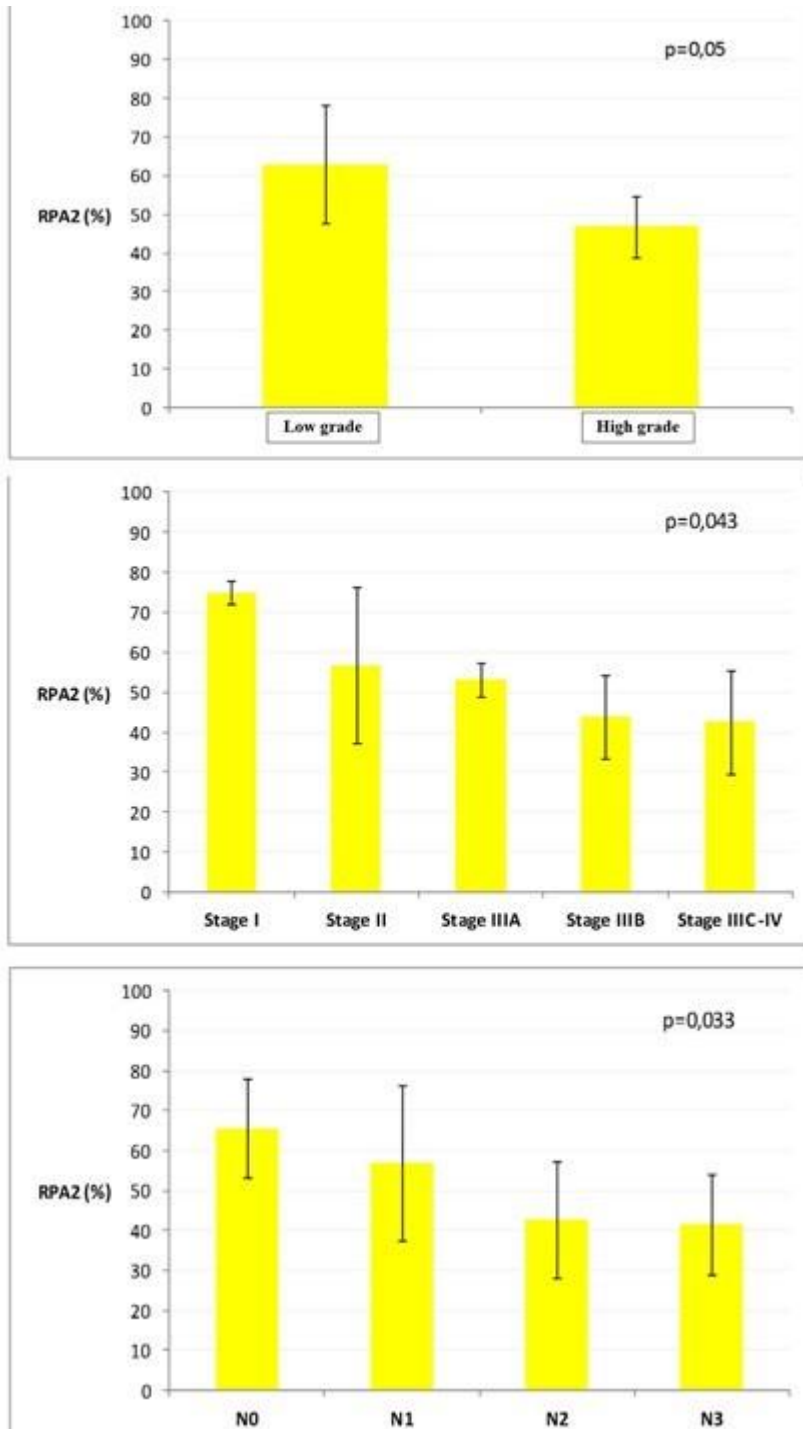
	B	SE	Wald	df	Sig.	HR	95,0% CI for HR		
							Lower	Upper	
Step 2	rpa1.100	-,036	,016	5,001	1	,025	,965	,934	,996
	LN	,358	,189	3,570	1	,059	1,430	,987	2,074



Εικόνα 1:

- A. Διάχυτη πυρηνική χρώση της RPA1 σε χαμηλόβαθμο γαστρικό καρκίνωμα ( $\times 100$ )
- B. Διάχυτη πυρηνική χρώση της RPA2 σε χαμηλόβαθμο γαστρικό καρκίνωμα ( $\times 200$ )
- Γ. Πυρηνική χρώση της RPA3 σε ένα ελάχιστα συμπαγές γαστρικό καρκίνωμα ( $\times 400$ )
- Δ. Πυρηνική χρώση της RPA3 σε αδένες γαστρικού καρκινώματος που διηθεί το μυϊκό τοίχωμα

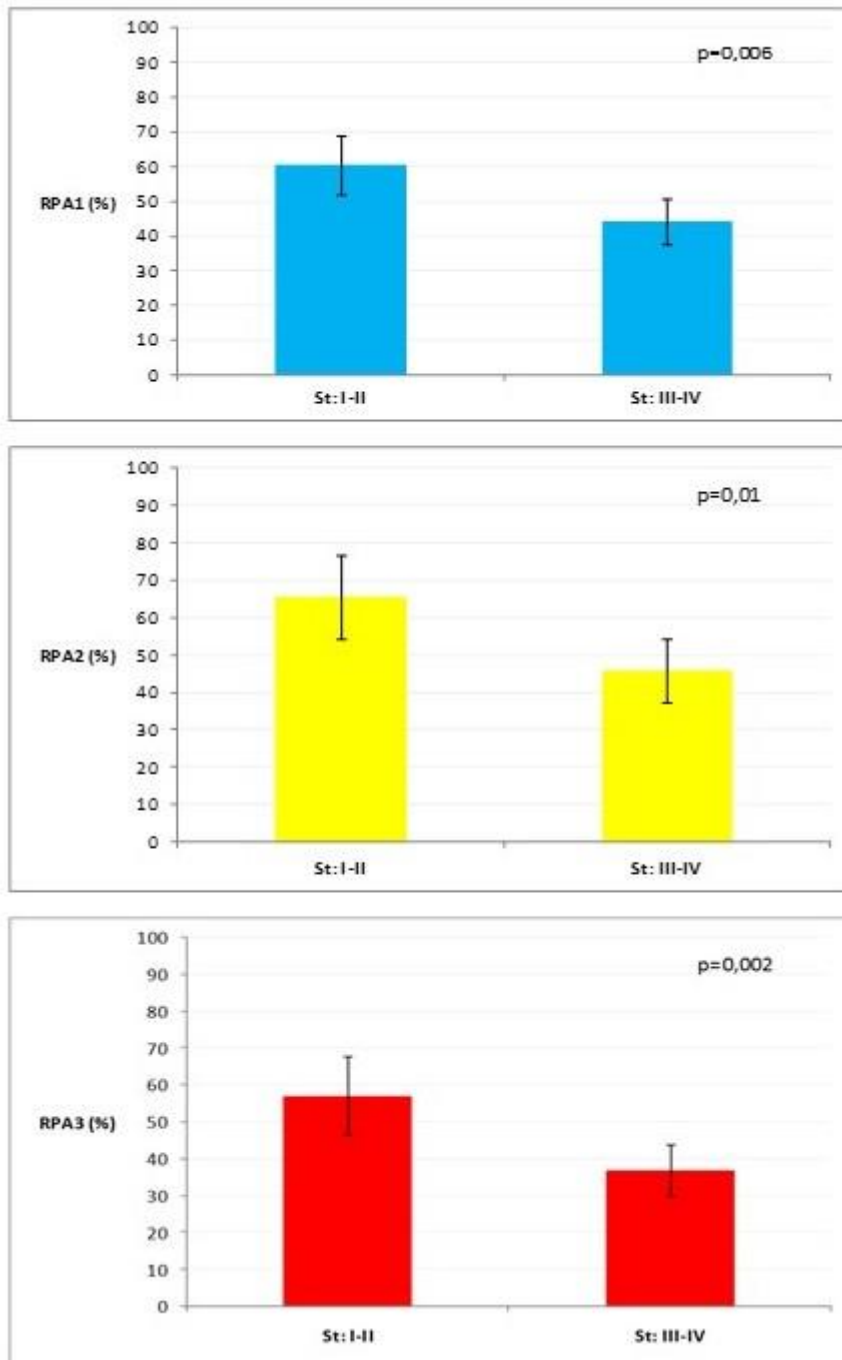
ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:  
 «ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ»  
 Μελέτη των πρωτεϊνών RPA1, RPA2, RPA3, Ki67 & TopoIIa – Κλινικοπαθολογοανατομικές συσχετίσεις



Εικόνα 2.

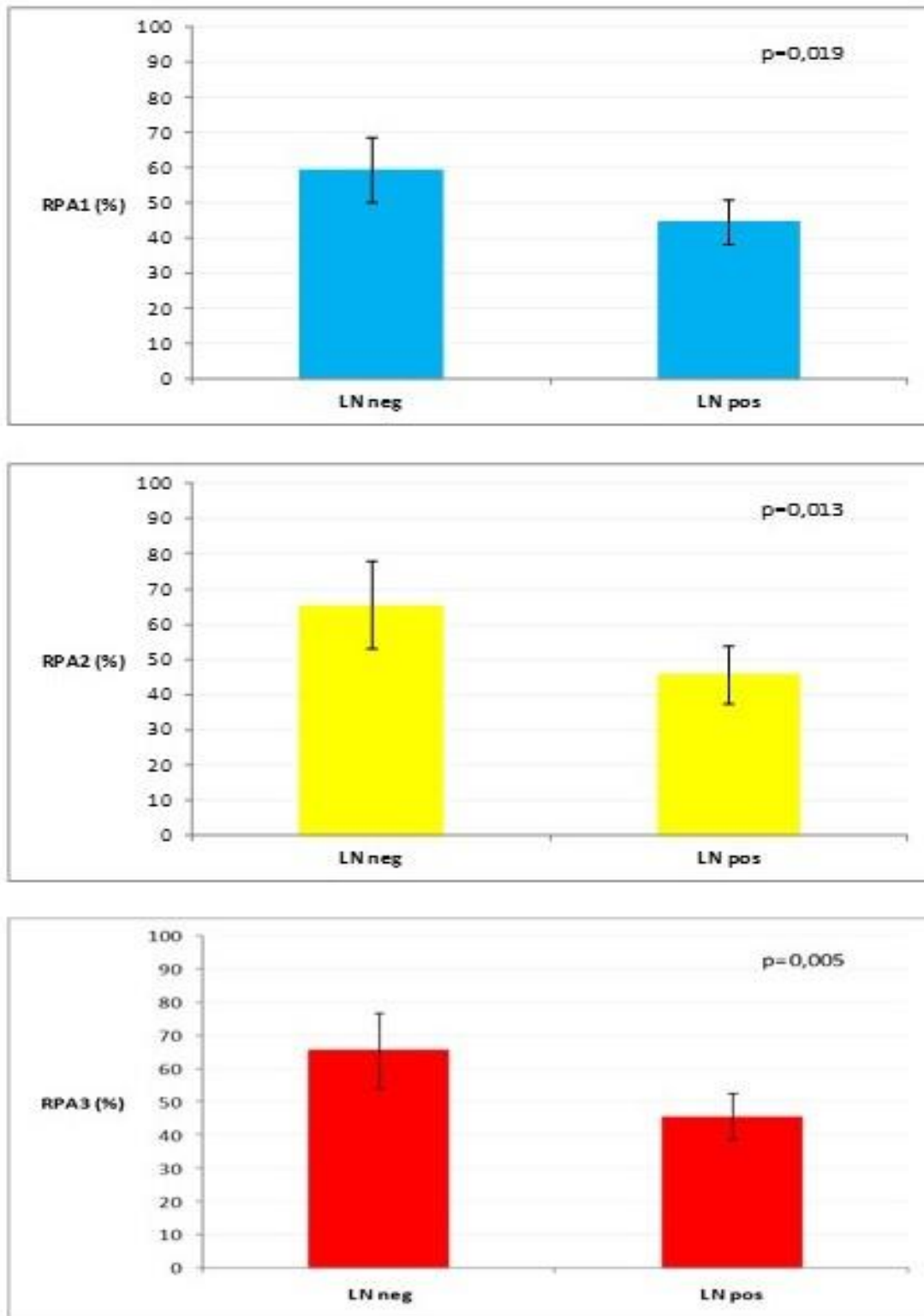
Συσχετισμός της RPA2 με ιστολογικό βαθμό, στάδιο της νόσου και κατάσταση των λεμφαδένων

ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:  
«ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ»  
Μελέτη των πρωτεϊνών RPA1, RPA2, RPA3, Κί67 & Τορο1α – Κλινικοπαθολογοανατομικές συσχετίσεις

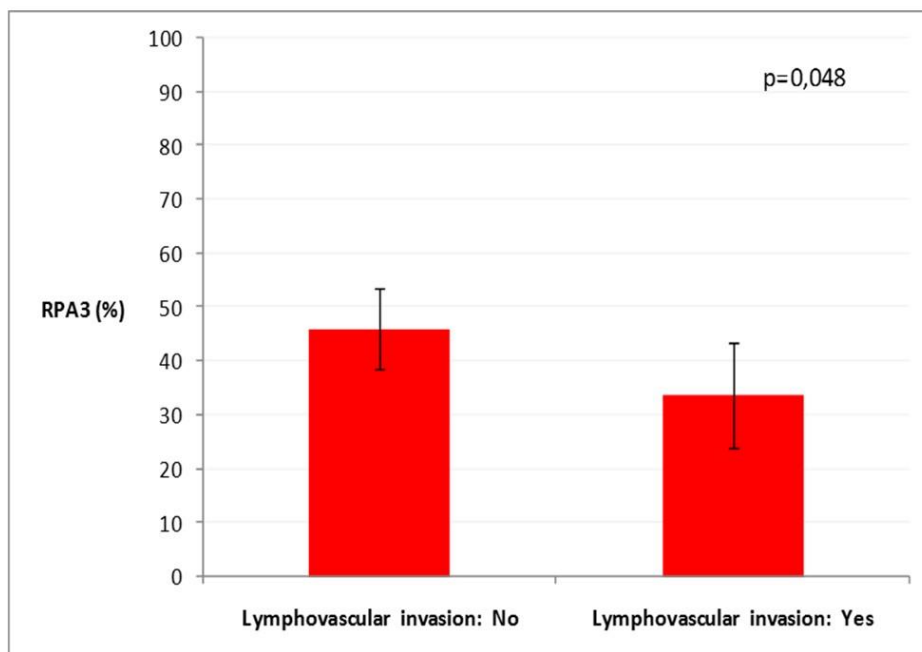


Εικόνα 3:

Γραφήματα των RPA1, RPA2 και RPA3 σε σχέση με το στάδιο της νόσου



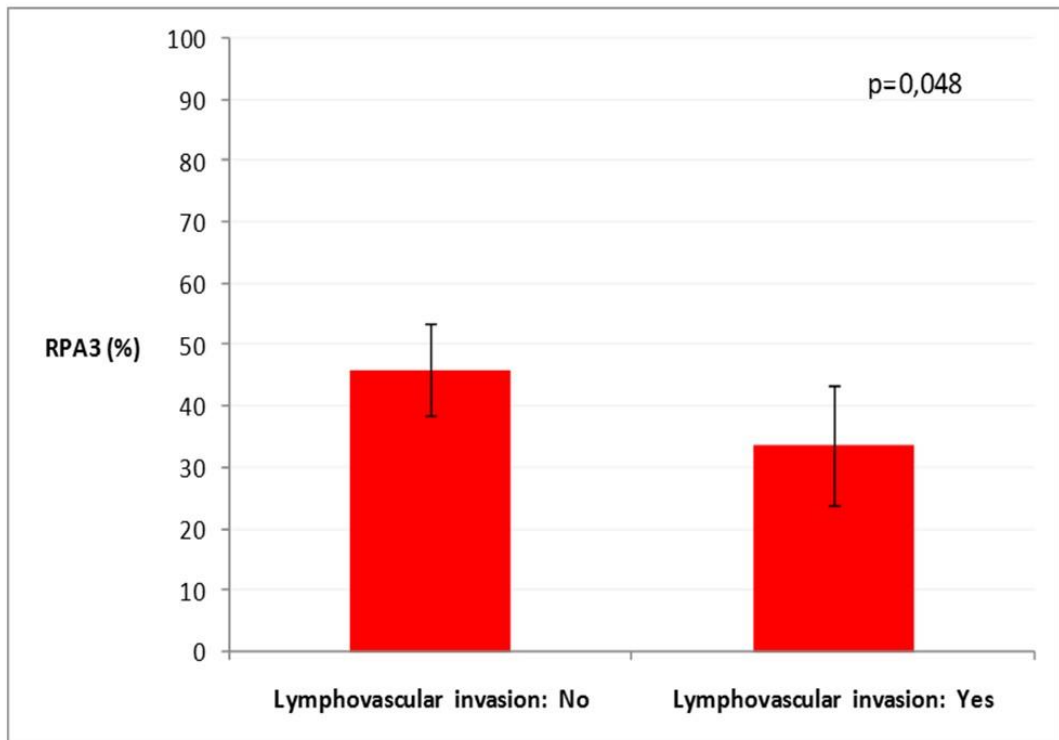
Εικόνα 4: Γραφήματα των RPA1, RPA2 και RPA3 σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο με και χωρίς λεμφαδενική μετάσταση



Εικόνα 5.

Γράφημα της RPA3 σε σχέση τη λεμφαγγειακή διήθηση

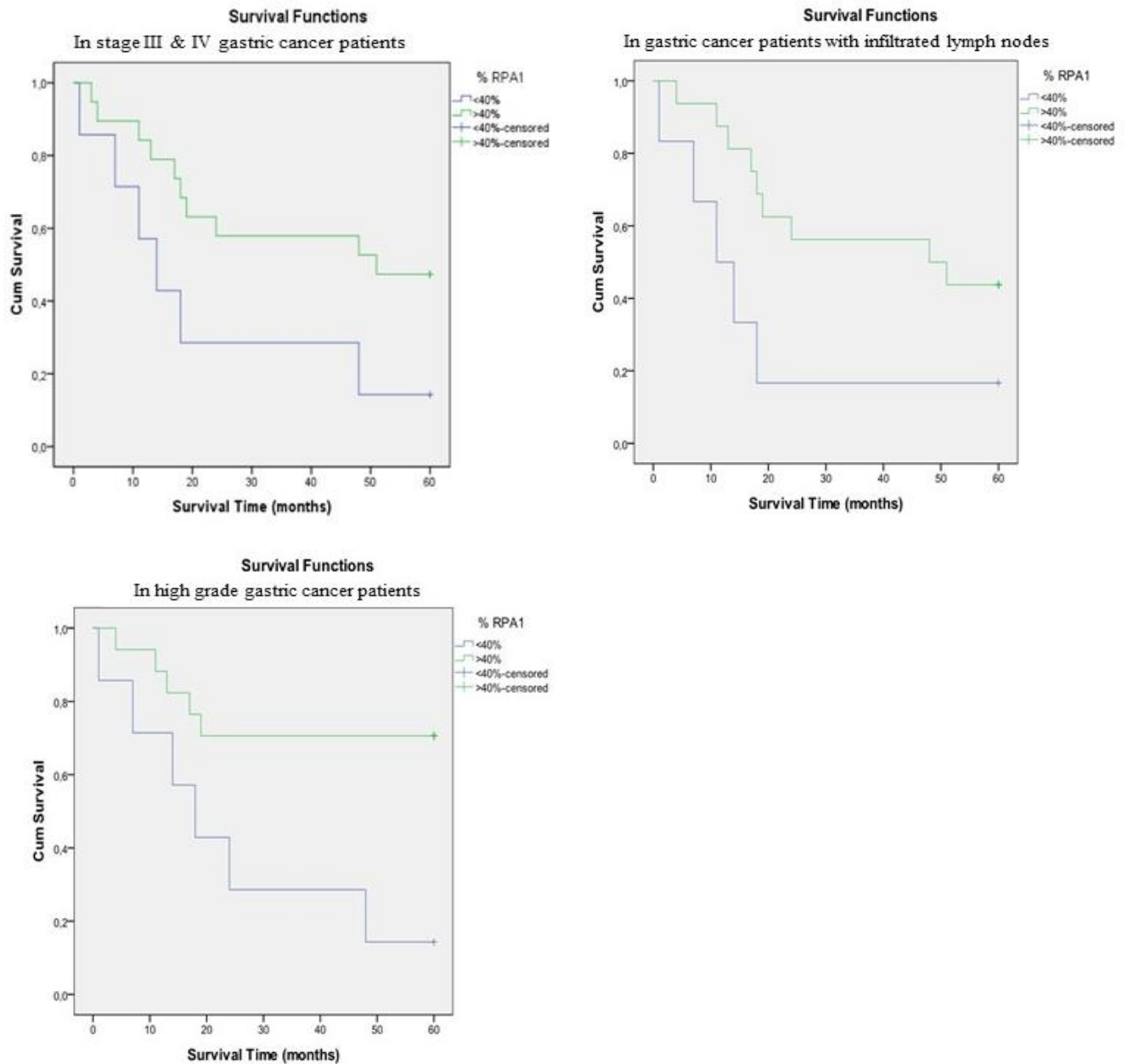




Εικόνα 6.

Μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης η οποία δείχνει σημαντικούς συσχετισμούς μεταξύ της κατάστασης των λεμφαδένων, του σταδίου της νόσου και την επιβίωση των ασθενών





Εικόνα 7.

Επίπτωση της RPA1 στην επιβίωση των ασθενών με λεμφαδενική διήθηση (N1-N3), στην επιβίωση ασθενών με καρκινώματα σταδίου III και IV και στην επιβίωση της ομάδας των ασθενών με υψηλόβαθμα καρκινώματα.

## Περίληψη

**Σκοπός:** Η πρωτεΐνη αντιγραφής A ( Replication proteinA – RPA ) αποτελείται από τρεις υπομονάδες (RPA1, RPA2 και RPA3) οι οποίες είναι απαραίτητες για όλα τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια του DNA. Αν και η RPA φαίνεται να είναι ένας πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος, ο ρόλος της στους ανθρώπινους καρκίνους δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά την έκφραση και των τριών υπομονάδων της RPA σε μια σειρά από 74 περιστατικά εξαιρεθέντων γαστρικών καρκινωμάτων και αναλύει τις πιθανές συσχετίσεις με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (ιστολογικός τύπος, βαθμός διαφοροποίησης, λεμφαγγειακή διήθηση, λεμφαδενική κατάσταση και στάδιο ασθένειας), με τον δείκτη πολλαπλασιασμού ki-67, με την έκφραση της Τοποϊσομεράσης IIa και με την επιβίωση των ασθενών.

**Μέθοδος:** Ανοσοϊστοχημεία με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση.

**Αποτελέσματα:** Όλες οι υπομονάδες παρουσίασαν γενικευμένη πυρηνική έκφραση στα γαστρικά καρκινώματα με σημαντικούς συσχετισμούς ανάμεσα στις εκφράσεις τους. Η RPA2 επέδειξε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης καρκινώματα και μια βαθμιαία σημαντική μείωση στα N0 έως N3 και στα στάδιου I έως σταδίου IV καρκινώματα. Όλες οι υπομονάδες ήταν στατιστικά σημαντικά αφθονότερες στα N0 και στα πρώιμου σταδίου (I και II) γαστρικά καρκινώματα. Κανένας συσχετισμός δεν επιβεβαιώθηκε ανάμεσα στις RPA και στον δείκτη πολλαπλασιασμού ki-67. Στους ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες και αυξημένο στάδιο όγκου η έκφραση της RPA1 φαίνεται να προβλέπει μια καλύτερη συνολικά επιβίωση υπονοώντας έναν πιθανό προγνωστικό ρόλο.

**Συμπεράσματα:** Η γενικευμένη έκφραση των RPA (1-3) υποδεικνύει έναν ή περισσότερους ρόλους στο γαστρικό καρκίνο. Η παρουσία τους σε όγκους πρώιμου σταδίου πιθανώς προσφέρει μια ευκαιρία για έγκαιρη στοχευμένη θεραπεία. Η πιθανή προγνωστική τους αξία σε όγκους με θετικούς λεμφαδένες και προχωρημένο στάδιο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση με σεβασμό στις ειδικές χημειοθεραπείες.

**Λέξεις κλειδιά:** Γαστρικός καρκίνος, Πρωτεΐνη αντιγραφής A (1-3), Επιβίωση

## Summary

**Purpose.** Replication Protein A (RPA) consists of three subunits (RPA1, RPA2 and RPA3) essential for all major DNA metabolic pathways. Although RPA seems to be a promising therapeutic target, its role in human cancers has not been fully elucidated. This is the first study investigating the expression of all the three RPA subunits in a series of 74 resected gastric carcinomas and analyzing the possible correlations with clinicopathological parameters (histological type, grade, lymphovascular invasion, lymph node status and disease stage), Ki-67 proliferative index, Topoisomerase IIa expression and patients' survival.

**Methods.** Immunohistochemistry using monoclonal antibodies. Univariate and multivariate statistical analysis.

**Results.** All the three subunits showed widespread nuclear expressions in gastric carcinomas with significant associations among their expressions. RPA2 demonstrated higher expression levels in low grade carcinomas and a gradual significant decrease from N0 to N3 and from stage I to stage IV carcinomas. All the three subunits were statistically significantly more abundant in lymph node negative and earlier stage (stage I & II) gastric carcinomas. No associations were established among RPAs and the proliferative marker Ki-67. In patients with positive lymph nodes and advanced tumor stage, RPA1 expression seemed to predict a better overall survival implying a probable predictive role.

**Conclusions.** The widespread expression of RPA(1-3) suggests one or more roles in gastric cancer. Their presence in earlier stage tumors probably offers an opportunity for early targeted therapy. Their probable predictive value in node positive and advanced stage tumors needs further investigation with respect to specific chemotherapeutic treatments.

**Keywords.** Gastric cancer, Replication Protein A (1-3), survival

JBUON 2020; 25(3): 1482-1489  
 ISSN: 1107-0625, online ISSN: 2241-6293 • www.jbuon.com  
 Email: editorial\_office@jbuon.com

## ORIGINAL ARTICLE

# Replication Protein A (RPA1, RPA2 and RPA3) expression in gastric cancer: correlation with clinicopathologic parameters and patients' survival

Efi Fourtziola<sup>1</sup>, Nick Givalos<sup>2</sup>, Nikolaos Alexakis<sup>3</sup>, John Griniatsos<sup>4</sup>, Nektarios Alevizopoulos<sup>5</sup>, Nikolaos Kavantzias<sup>1</sup>, Andreas C Lazaris<sup>1</sup>, Penelope Korkolopoulou<sup>1</sup>, Hariklia Gakiopoulou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>1<sup>st</sup> Department of Pathology, School of Medicine, The National and Kapodistrian University of Athens, Greece. <sup>2</sup>2<sup>nd</sup> Department of General Surgery, General Hospital of Attica "KAT", Athens, Greece. <sup>3</sup>3<sup>rd</sup> First Department of Propaedeutic Surgery, The National and Kapodistrian University of Athens, Hippocratio Hospital, Athens, Greece. <sup>4</sup>4<sup>th</sup> Department of Surgery, Medical School, The National and Kapodistrian University of Athens, Laikon General Hospital, Athens, Greece. <sup>5</sup>Department of Oncology, Evangelismos General Hospital, Athens, Greece.

## Summary

**Purpose:** Replication Protein A (RPA) consists of three subunits (RPA1, RPA2 and RPA3) essential for all major DNA metabolic pathways. Although RPA seems to be a promising therapeutic target, its role in human cancers has not been fully elucidated. This is the first study investigating the expression of all the three RPA subunits in a series of 74 resected gastric carcinomas and analyzing the possible correlations with clinicopathologic parameters (histological type, grade, lymphovascular invasion, lymph node status and disease stage), Ki-67 proliferative index, Topoisomerase IIa expression and patients' survival.

**Methods:** Immunohistochemistry using monoclonal antibodies. Univariate and multivariate statistical analysis.

**Results:** All the three subunits showed widespread nuclear expressions in gastric carcinomas with significant associations among their expressions. RPA2 demonstrated higher expression levels in low grade carcinomas and a gradual

significant decrease from N0 to N3 and from stage I to stage IV carcinomas. All the three subunits were statistical significantly more abundant in lymph node negative and earlier stage (stage I & II) gastric carcinomas. No associations were established among RPAs and the proliferative marker Ki-67. In patients with positive lymph nodes and advanced tumor stage, RPA1 expression seemed to predict a better overall survival implying a probable predictive role.

**Conclusions:** The widespread expression of RPA(1-3) suggests one or more roles in gastric cancer. Their presence in earlier stage tumors probably offers an opportunity for early targeted therapy. Their probable predictive value in node positive and advanced stage tumors needs further investigation with respect to specific chemotherapeutic treatments.

**Key words:** gastric cancer, Replication Protein A (1-3), survival

## Introduction

Replication protein A (RPA) is the major single-strand DNA (ssDNA) binding complex in eukaryotes [1]. RPA is essential for all major DNA metabolic pathways, including DNA replication, repair, recombination, cell cycle progression, and the DNA damage response, playing a role as a sensor in multiple

DNA checkpoint pathways [1-5]. RPA is required for each of the four major DNA repair pathways: nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER), DNA mismatch repair (MMR), and DNA double strand break (DSB) repair [1]. Human RPA is present in cells as a heterotrimeric complex consist-

Corresponding author: Hariklia Gakiopoulou, MD, PhD. 1<sup>st</sup> Department of Pathology, School of Medicine, The National and Kapodistrian University of Athens, Greece, 75 Mikras Asias Str, Goudi, 11527, Athens, Greece.  
 Tel: +30 210 7462170, Email: charagak28@gmail.com, chgakiop@meduoa.gr  
 Received: 20/10/2019; Accepted: 15/11/2019



ing of three subunits which, in order of decreasing size, have been designated as RPA1 (70kDa), RPA2 (32kDa) and RPA3 (14kDa) [6-8]. We have previously shown that RPA expression is upregulated in human tumors including colon cancer, urothelial bladder cancer, ovarian cancer and astrocytic tumors [9-12]. Other investigators have also shown RPA upregulation in esophageal, breast, nasopharyngeal and hepatocellular carcinomas [13,14].

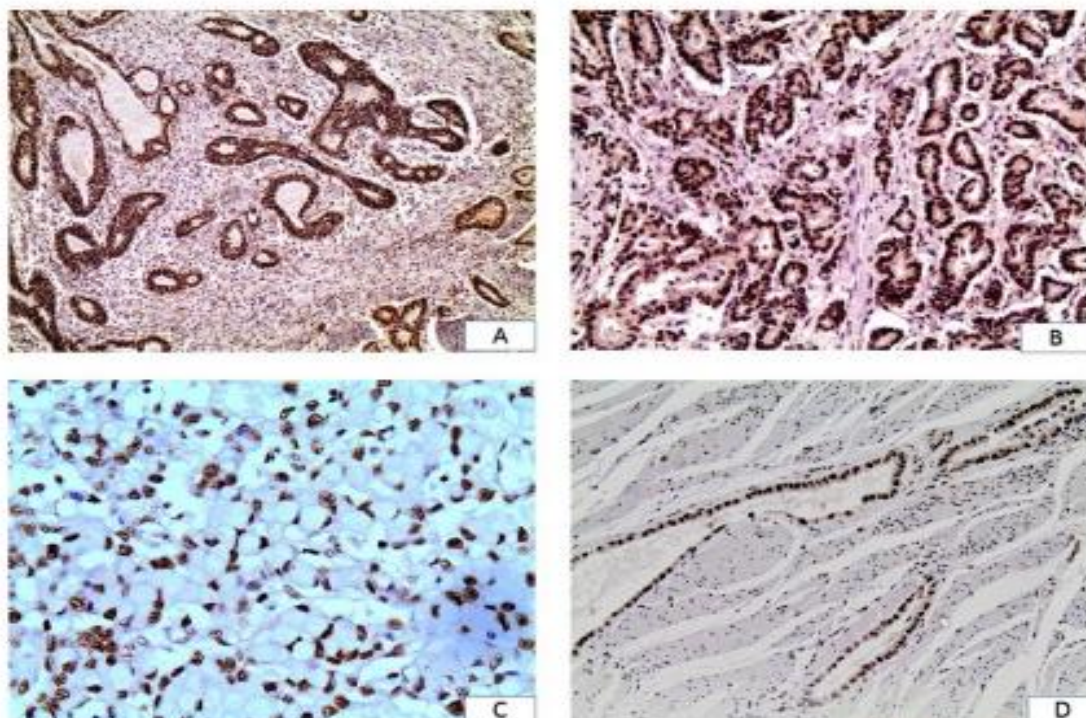
However, there is very limited data concerning gastric cancer. Recently, it has been shown that forced over-expression of miR-30a in the gastric cancer cell line SGC7901R inhibited cell proliferation by hindering the replication of DNA and inducing DNA fragmentation [15]. Interestingly, the target of miR-30a was identified as the DNA replication protein RPA1 suggesting that exploiting DNA replication through RPA might be exploited as a target for cancer therapy [15]. There is one previous study investigating the third subunit of RPA (RPA3) expression in human gastric cancer and reporting that RPA3 upregulation is involved in tumorigenic properties of gastric cancer cells [16]. However, to the best of our knowledge, no previous study has investigated all the three subunits of the RPA protein in gastric cancer.

The aim of the present study was to investigate the immunohistochemical expression of RPA1, RPA2 and RPA3 proteins in a series of 74 gastric cancer resection specimens. Moreover, RPA1, RPA2 and RPA3 expression was analyzed in relation to conventional clinicopathologic parameters (age, gender, grade, lymph node status, lymphovascular invasion and stage of the disease), Ki-67 index, TopoIIa expression and patients' survival.

## Methods

### Patients

This is a retrospective study of 74 patients who presented with primary gastric carcinoma, for whom paraffin-embedded tissue and clinical information were available. There were 51 men and 23 women with a median age of 69 years (range 35-91). None of the patients had received chemotherapy or radiation before surgery. According to the 8th edition of the TNM system of cancer staging adopted by the American Joint Committee on Cancer and the International Union Against Cancer (AJCC/IUCC), tumors were classified as stage I: 10 cases, stage II: 13 cases, stage III: 49 cases, and stage IV: 2 cases. All cases were reviewed and assigned a histologic grade according to WHO 2019 classification of gastric carcinomas: there were 21 low grade and 53 high



**Figure 1.** A: Diffuse RPA1 nuclear staining in a low grade gastric carcinoma (x100). B: Diffuse RPA2 nuclear staining in a low grade gastric carcinoma (x200). C: RPA3 nuclear staining in a poorly cohesive gastric carcinoma (x400). D: RPA3 nuclear staining in gastric carcinoma glands infiltrating muscle wall (x400).



grade carcinomas. The median follow-up period was 60 months. During this period, 10 disease-specific deaths were recorded.

#### Processing of specimens and immunohistochemistry

Tissues were fixed immediately after removal in 10% buffered formalin and processed to paraffin wax. Four  $\mu\text{m}$  serial sections were cut from each specimen on superfrost plus glass slides and left to dry overnight at 37°C. Immunohistochemical detection of RPA1, RPA2 and RPA3 proteins was performed by standard streptavidin-peroxidase method using the monoclonal antibodies anti-RPA1 (P70 subunit, NA13, oncogene), anti-RPA2 (P32 subunit, NA18, oncogene) and anti-RPA3 (P14 subunit, clone 1F4, Abnova) in a dilution of 1:50 for each antibody. To enhance antigen retrieval sections underwent microwave treatment (using 1 Mm EDTA PH 8.0). For negative controls, normal goat serum was used

instead of primary antibody at 4°C overnight prior to the following staining procedure. Staining for all antibodies was assessed blindly (ie without any knowledge of the clinical data) by two observers. Whenever a difference of greater than 5% between the two assessments was observed, slides were reviewed jointly and a consensus was reached. Nuclei from about 1000 tumor cells from systematically randomized fields ( $> 40$ ) throughout the entire section were counted and the labelling index (LI) was calculated as the percentage of labelled nuclei out of the total number of tumor cells counted. All clearly identifiable nuclear staining beyond background was recorded as positive for RPA1, RPA2 and RPA3. No lymphoid cells were included in the counts even though they expressed RPA1, RPA2 and RPA3.

#### Statistics

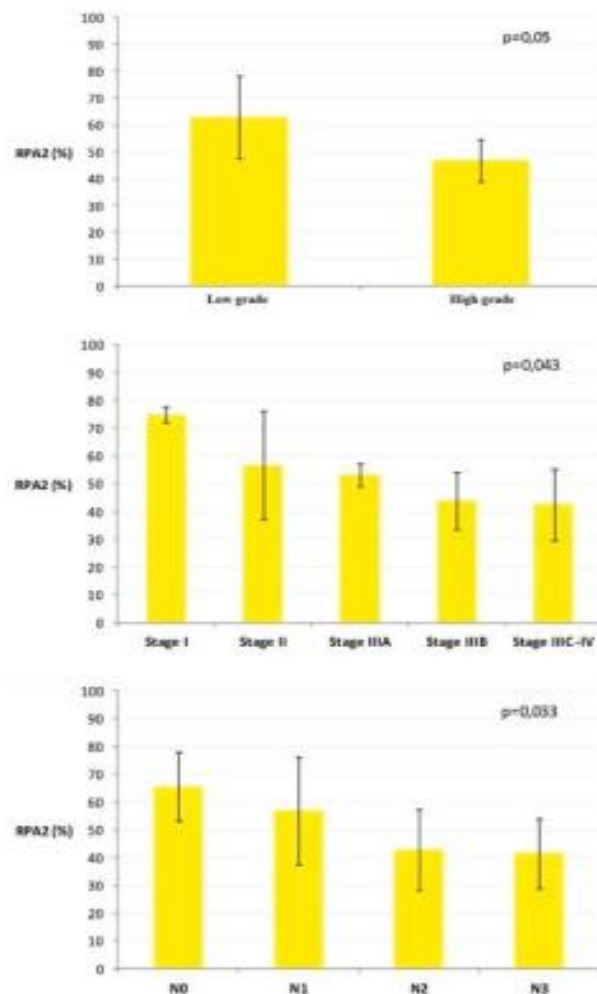
The normality of distributions was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. Pearson's Chi-square with continuity correction and ANOVA test were used to assess possible correlations between RPA1, RPA2 & RPA3 expressions with the clinicopathologic parameters investigated. The prognostic effect of various parameters (ie age, gender, histologic type, grade, lymph node status, lymphovascular invasion, stage, RPA1, RPA2, RPA3, Ki-67 and TOPO IIA expression) on clinical outcome (ie death of disease) was tested by plotting survival curves according to Kaplan-Meier method and comparing groups using the log rank test, as well as by multivariate analysis using the Cox regression model. Patients dying of other causes during the follow-up period were treated as censored data. To avoid any 'data-driven' categorization, continuous variables were entered in multivariate analysis as continuous variables. Statistical analyses were performed using the SPSS for Windows Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A p value of less than or equal to 0.05 was considered indicative of a statistically significant difference.

## Results

RPA1, RPA2 and RPA3 nuclear immunoreactivity was observed in all carcinomas examined. RPA1, RPA2 and RPA3 LIs ranged from 2 to 85% for RPA1 and RPA3 and from 2 to 90% for RPA2, with a median of 40%, 50% and 40% for RPA1, RPA2 and RPA3, respectively. The pattern of staining was mostly nuclear, although a faint cytoplasmic staining was seen in a few cases, which was disregarded as non-specific (Figure 1). Nuclear staining was strong to moderate in almost all cases investigated.

Moreover, RPA1, RPA2 and RPA3 nuclear immunoreactivity was also seen in normally-appearing gastric mucosa adjacent to carcinomas, in all examined cases. In normal mucosa, positive cells were evenly distributed and did not occur in clusters.

In carcinomas, immunostaining for Ki-67 and Topoisomerase IIA were also found in all carcino-



**Figure 2.** RPA2 association with histological grade, stage of disease and lymph node status.

## RPA expression in gastric cancer

1485

mas ranging from 5 to 90% for each protein (median: 45% and 40%, respectively). Ki-67 and Topoisomerase IIA expressions, were significantly lower in the adjacent normal epithelium compared to cancers.

Strong positive correlations emerged, using the Pearson's correlation test, between RPA1 and RPA2 ( $p=0.002$ ), RPA1 and RPA3 ( $p<0.0001$ ), RPA2 and RPA3 ( $p<0.0001$ ) expressions. A significant correlation was also found between Ki-67 and Topoisomerase IIA expressions ( $p<0.0001$ ). No significant associations were found between RPAs and either Ki-67 or Topoisomerase IIA expression, when analyzed in the whole cohort. However, when investigating these associations stage by stage, significant correlations emerged in stage I carcinomas between RPA2 protein and Topoisomerase IIA expressions ( $p=0.05$ ) and between RPA3 protein and Topoisomerase IIA expressions ( $p=0.04$ ) as well. No significant correlations were established between RPA1 or RPA3 and Topoisomerase IIA nor among RPAs and Ki-67 expressions.

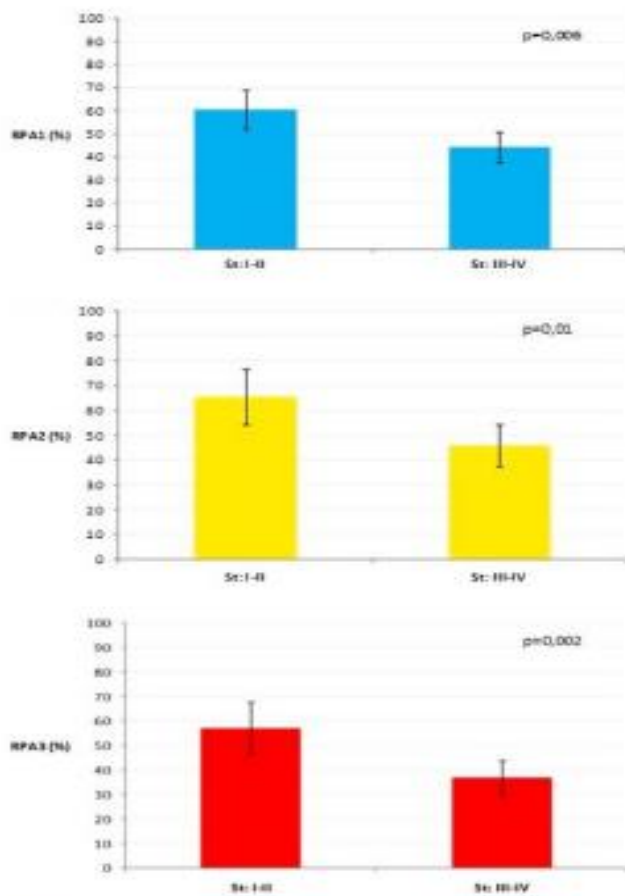


Figure 3. RPA1, RPA2 and RPA3 LIs in association with stage of disease.

When analyzing the relationship between RPA1, RPA2 or RPA3 expression and the various clinicopathologic parameters, using ANOVA test, a statistical significant inverse correlation was established between RPA2 labeling index and histologi-

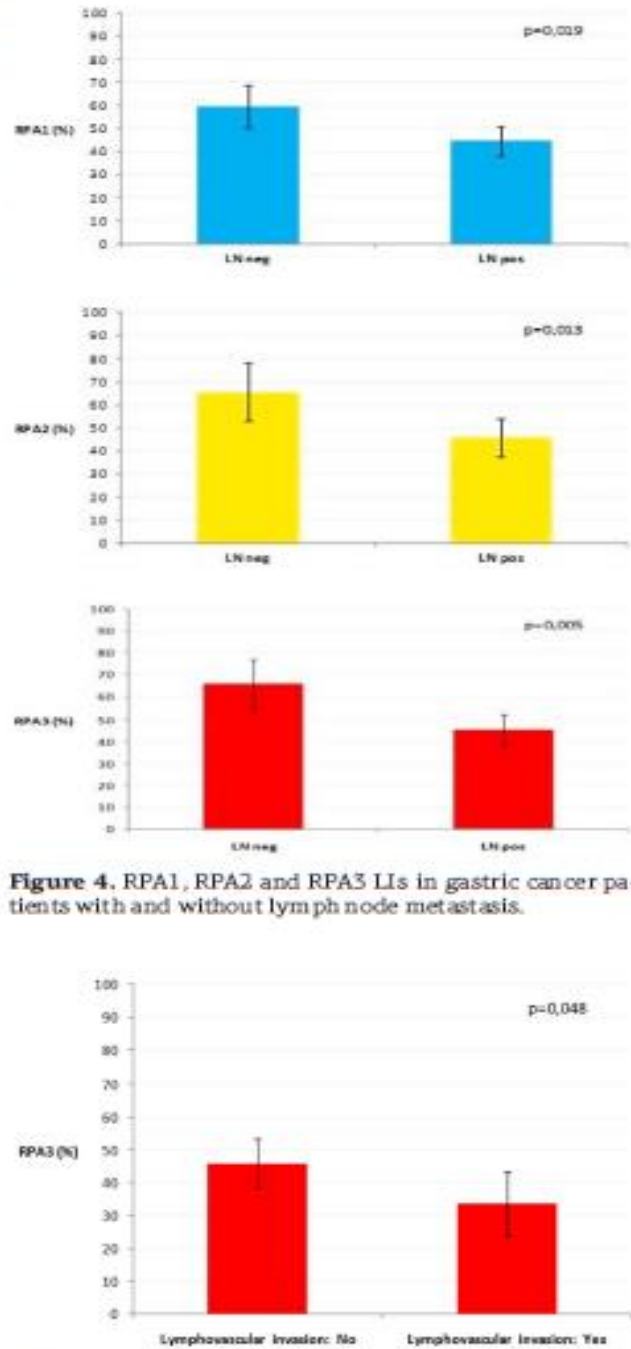


Figure 4. RPA1, RPA2 and RPA3 LIs in gastric cancer patients with and without lymph node metastasis.

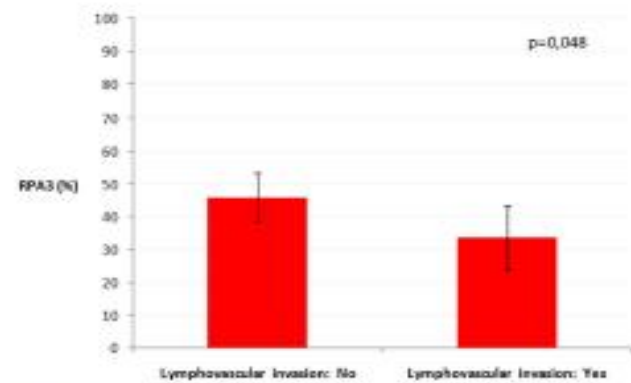


Figure 5. RPA3 LI in association with lymphovascular invasion.



cal grade ( $p=0.05$ ) in that high grade carcinomas demonstrated lower RPA2 expression than low grade carcinomas (Figure 2). No significant correlation emerged between each protein and histologic type (according Lauren's or WHO classification).

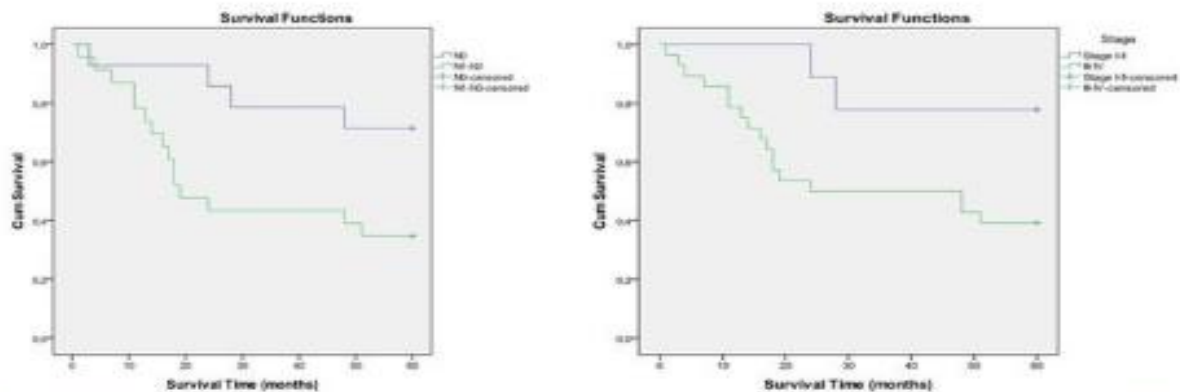
A gradual decrease in RPA2 labeling index was observed from stage I to stage IV carcinomas and this association was of statistical significance ( $p=0.043$ ) (Figure 2).

RPA1, RPA2 and RPA3 labeling indices were significantly higher in stage I and II carcinomas compared to stage III and IV carcinomas ( $p= 0.006$ ,  $p= 0.01$  and  $p=0.002$  respectively) (Figure 3).

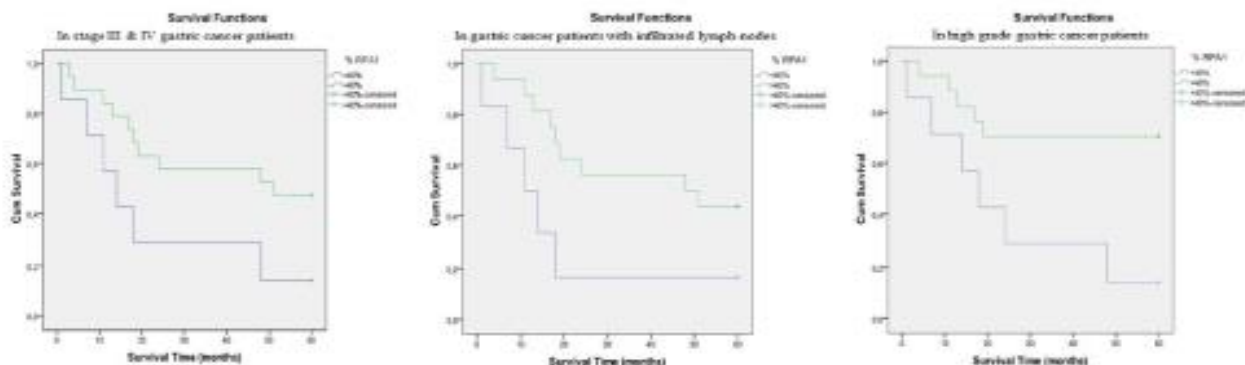
When analyzing the associations among RPAs and staging parameters (T and N), we found that RPA1, RPA2 and RPA3 expressions were significantly higher in patients without lymph node metastasis (N0) compared to patients with infiltrated lymph nodes (N1, N2 and N3) ( $p= 0.019$ ,  $p=0.013$  and  $p=0.005$ , respectively, Figure 4). Moreover, a gradual decrease of RPA2 labeling index from N0

to N3 lymph node status was also noted ( $p=0.033$ , Figure 2). A significantly lower RPA3 labeling index was recorded in cases with lymphovascular invasion ( $p=0.048$ , Figure 5). No association with T-category was established.

In univariate survival analysis, lymph node status [Log Rank (Mantel-Cox):  $p=0.026$ , chi-square: 4.962, df:1] and stage of disease [Log Rank (Mantel-Cox):  $p=0.047$ , chi-square: 3.934, df:1] showed statistically significant correlations with patients' survival (Figure 6). In the group of patients with stage III & IV carcinomas, in the group of patients with infiltrated lymph nodes (N1-N3) and in the group of patients with high grade carcinomas, we found significant associations between RPA1 labeling index greater than 40% and a better overall survival [Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0.05$  and  $p=0.05$  and  $p=0.014$  respectively, Figure 7]. In multivariate Cox's regression analysis of the whole cohort, significant associations with survival were found for lymph node status and RPA1 ( $p=0.025$ ; Table 1).



**Figure 6.** Univariate survival analysis showing significant correlations between lymph node status, stage of disease and patients' survival.



**Figure 7.** RPA1 impact on survival of patients with infiltrated lymph nodes (N1-N3), stage III & IV carcinomas, and in the group of patients with high grade carcinomas.



## RPA expression in gastric cancer

1487

**Table 1.** COX regression analysis. Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	HR	95.0% CI for HR	
							Lower	Upper
Step 2 rpa1.100	-.036	.016	5.001	1	.025	.965	.934	.996
LN	.358	.189	3.570	1	.059	1.430	.987	2.074

**Discussion**

This is the first study investigating the immunohistochemical expression of all the three subunits of RPA protein in gastric cancer. According to our results, RPA1, RPA2 and RPA3 proteins showed a widespread nuclear expression in gastric carcinomas, in keeping with our previous results in other types of human cancer such as colon, bladder, ovarian and astrocytic tumors [9-12]. Moreover, all the three subunits were expressed in the adjacent, apparently normal gastric mucosa, in keeping with our results concerning RPA1 and RPA2 in normal colon mucosa adjacent to carcinomas. The widespread expression of RPAs in normal appearing mucosa, reflects the role of these proteins under physiological conditions, in the regulation of DNA replication or as a part of the reparatory genomic machinery. In view of the above, the widespread presence of RPAs in cancer cells suggests that their expression is not lost during malignant transformation. Moreover, it seems that RPA proteins have a role to play in malignant cells, although probably not the same to their role in normal cells.

One of the many differences between normal cells and cancer cells is the amount of replication stress that occurs during replication. Cancer cells with activated oncogenes generate increased levels of replication stress [17]. Replicative stress seems to be unique to cancer cells since it is rarely observed in normal cells even when they proliferate rapidly [17]. It has been shown that RPA inhibition increases the replication stress and suppresses tumor growth [18]. This might designate a role of RPAs in cancer cells and explain their widespread expression in gastric and other carcinomas. In other words, it seems logical that RPAs facilitate tumor growth helping cancer cells to withstand the replicative stress.

In view of the increasing levels of replication stress in cancer cells and the reported role of RPAs in decreasing this stress, it would be probably expected an increasing need for RPAs in carcinomas with higher proliferation rates. However, in our study, no significant associations were established between RPAs and the proliferation marker Ki-67. This finding is in keeping with the results reported in ovarian carcinomas [11]. In bladder cancer we have seen a positive association between RPA1 and

RPA2 and cyclin D1 expression [10]. Recently, it has been shown that in hepatocellular carcinoma cells (HCC), RPA1 influences cell cycle through CDK4/Cyclin-D pathway [19]. CDK-4/cyclin-D expression helps cell overcome the restriction between G1 and S phase. So RPA1 promotes HCC proliferation with up-regulation of CDK-4/cyclin-D, indicating that RPA1 functions to drive more HCC cells into S and G2 phases [19]. It has been shown that in gastric carcinomas, the D-type cyclins reach maximum levels of expression and form functional complexes with CDK4 during the mid-G1 phase [20]. On the other hand, it has been recently suggested that Ki67 is a graded rather than a binary marker both for cell-cycle progression and time since entry into quiescence [21]. Miller et al reported that Ki-67 accumulation occurs only during S, G2, and M phases and that it is degraded continuously in G1 and G0 phases, regardless of the cause of entry into G0/quiescence. Consequently, the level of Ki67 during G0 and G1 in individual cells is highly heterogeneous and depends on how long an individual cell has spent in G0 [21]. The above observations might probably explain the absence of significant correlations between RPAs and Ki-67 expressions.

Another interesting finding of this study was the correlations between RPAs expressions and clinicopathologic parameters such as grade, lymphovascular invasion, lymph node status and the stage of disease. Similar associations have been previously recorded in bladder carcinomas, suggesting that the proper function of the RPA machinery in these tumors, may be preserved in the better differentiated and less advanced tumors [10]. However, this is an issue that requires more studies to be clarified since these associations may be organ or cancer type-dependent, as, for instance, our study in colon carcinomas revealed parallel associations with tumor grade and/or stage. Our survival analysis suggested that higher RPA1 expression was significantly associated with better overall survival in the group of patients with lymph node metastasis or advanced disease stage. This finding could imply a possible predictive value of RPA1 with respect to chemotherapy given in lymph node-positive and advanced stage patients. In multivariate survival analysis RPA1 retained its significance along with lymph node status.

JBUON 2020; 25(3): 1487



A limitation of our study, as it happens with most immunohistochemical studies, is the inability to discern the functional status of the immunohistochemically expressed proteins. It is not certain that the immunohistochemically detected protein is functionally intact. RPA is hyperphosphorylated upon DNA damage or replication stress by checkpoint kinases including ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3-related) and DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) [22]. The hyperphosphorylation may change the functions of RPA and, thus, the activities of individual pathways in which it is involved [22]. There is growing evidence that hyperphosphorylation alters RPA-DNA and RPA-protein interactions [22]. Apart from hyperphosphorylation, extensive genetic analysis of the yeast homologue of RPA1 (RPA1) has shown that viable mutations in this gene exhibit defects in DNA repair, recombination, and elevated chromosome rearrangements and mutation rates [23]. In mammals, the L221P RPA1 mutation causes a defect in ssDNA binding and a nonfunctional protein complex, causing an increase in the levels of DNA damage and in the incidence of cancer [24]. Whether the observed in our study proteins are hyperphosphorylated, mutated, functional or not, and if the reduced expression levels in the less differentiated and more advanced tumors is a consequence of accumulating mutations or other cancer progression related events, needs further investigation.

On the other hand, the widespread presence of RPAs in gastric cancer offers a potential target for therapeutic intervention. It has been shown that RPA proteins are involved in the ATR/Chk1 pathway which is a critical surveillance network that maintains genomic integrity during DNA replication by stabilizing the replication forks during normal replication to avoid replication stress [18]. This creates an increased dependency on the ATR/Chk1 pathway in cancer cells [18]. Glanzer et al have identified a novel protein termed HAMNO which inhibits RPA through selectively binding to the N-terminal domain of RPA 70 and by inhibiting both ATR autophosphorylation and phosphorylation of RPA 32Ser33 by ATR [18]. According to Glanzer et al, HAMNO treatment creates DNA

replication stress in cancer cells that are already experiencing replication stress, but not in normal cells, and it acts synergistically with etoposide to kill cancer cells *in vitro* and slow tumor growth *in vivo* [18]. Thus, HAMNO illustrates how RPA inhibitors represent candidate therapeutics for cancer treatment, providing disease selectivity in cancer cells by targeting their differential response to replication stress [18]. One could postulate that targeted inhibition of the RPAs might open up an opportunity to preferentially kill cancer cells by inhibiting this pathway. Moreover, in a recent study exploring the role of RPA in gastric cancer cells, silencing of RPA1 induced cell cycle arrest at the G1 phase and promoted cell apoptosis by regulating the protein level of Caspase 3 [25]. The observed in our study RPA expression upregulation in gastric cancer might thus provide an opportunity for targeted intervention.

In conclusion, our study has demonstrated for the first time the widespread expression of all the three RPA subunits in gastric cancer. This expression seems to be more abundant in low grade tumors without lymph node metastasis and in the earlier stages of disease. Further studies are required to clarify the functional status of RPA in gastric carcinomas inasmuch as it has been suggested that RPA influences chemoresistance [26,27]. More specifically, it has been reported that in ovarian tumors, cisplatin cancer cell killing is potentiated by mutations that cripple RPA binding to DNA and that modulation of RPA protein levels/dynamics is a critical determinant of chemoresistance via multiple mechanisms (27,28). Under these observations, and as it happens with other markers associated with favorable prognosticators which act simultaneously as predictive factors (for instance hormonal receptors in breast cancer) the predictive value of RPA needs further investigation as RPA expression could offer an opportunity for targeted inhibition.

### Conflict of interests

There are no conflicts of interest that could be perceived to bias this work, nor financial support or any other personal connections.

### References

1. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 1997;66:61-92.
2. Iftode C, Daniely Y, Borowiec JA. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1999;34:141-80.

3. Kim HS1, Brill SJ. Rfc4 interacts with Rpa1 and is required for both DNA replication and DNA damage checkpoints in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2001;21:3725-37.
4. Dodson GE, Shi Y, Tibbetts RS. DNA replication defects, spontaneous DNA damage, and ATM-dependent checkpoint activation in replication protein A-deficient cells. *J Biol Chem* 2004;279:34010-4.
5. Fanning E, Klimovich V, Nager AR. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* 2006;34:4126-37.
6. Erdile LF, Heyer WD, Kolodner R et al. Characterization of a cDNA encoding the 70-kDa single-stranded DNA-binding subunit of human replication protein A and the role of the protein in DNA replication. *J Biol Chem* 1991;266:12090-8.
7. Erdile LF, Wold MS, Kelly TJ. The primary structure of the 32-kDa subunit of human replication protein A. *J Biol Chem* 1990;265:3177-82.
8. Umbricht CB, Griffin CA, Hawkins AL et al. High-resolution genomic mapping of the three human replication protein A genes (RPA1, RPA2, and RPA3). *Genomics* 1994;20:249-57.
9. Givalos N, Gakiopoulou H, Skliri M, Bousboukea K, Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, et al. Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer. *Mod Pathol* 2007;20:159-66.
10. Levidou G, Gakiopoulou H, Kavantzias N et al. Prognostic significance of replication protein A (RPA) expression levels in bladder urothelial carcinoma. *BJU Int* 2011; (2 Pt 2):E59-65.
11. Levidou G, Ventouri K, Nonni A et al. Replication protein A in non early ovarian adenocarcinomas: correlation with MCM-2, MCM-5, Ki-67 index and prognostic significance. *Int J Gynecol Pathol* 2012;31:319-27.
12. Kanakis D, Levidou G, Gakiopoulou H, Eftichiadis C, Thymara I, Fragkou P, et al. Replication protein A: a reliable biologic marker of prognostic and therapeutic value in human astrocytic tumors. *Hum Pathol* 2011;42:1545-53.
13. Dahai Y, Sanyuan S, Hong L, Di Z, Chong Z. A relationship between replication protein A and occurrence and prognosis of esophageal carcinoma. *Cell Biochem Biophys* 2013;67:175-80.
14. Xiao W, Zheng J, Zhou B, Pan L. Replication Protein A 3 Is Associated with Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis and Poor Patient Survival. *Dig Dis* 2018;36:26-32.
15. Zou Z, Ni M, Zhang J et al. miR-30a can inhibit DNA replication by targeting RPA1 thus slowing cancer cell proliferation. *Biochem J* 2016;473:2131-9.
16. Dai Z, Wang S, Zhang W, Yang Y. Elevated Expression of RPA3 Is Involved in Gastric Cancer Tumorigenesis and Associated with Poor Patient Survival. *Dig Dis Sci* 2017;62:2369-75.
17. Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15:276-89.
18. Glanzer JG, Liu S, Wang L, Mosel A, Peng A, Oakley GG. RPA Inhibition Increases Replication Stress and Suppresses Tumor Growth. *Cancer Res* 2014;74:5165-72.
19. Wang J, Yang T, Chen H, Li H, Zheng S. Oncogene RPA1 promotes proliferation of hepatocellular carcinoma via CDK4/Cyclin-D pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;498:424-30.
20. Casasola SV, Colunga MJM, Millán OA, Rodríguez JMM. Prognostic value of clinicopathologic factors Ki67, cyclin D1, cyclin D3 and CDK4 in gastric carcinoma. *Oncología* 2004;27:537-43.
21. Miller I, Min M, Yang C et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell Reports* 2018;24:1105-12.
22. Zou Y, Liu Y, Wu X, Shell SM. Functions of Human Replication Protein A (RPA): From DNA Replication to DNA Damage and Stress Responses. *J Cell Physiol* 2006;208:267-75.
23. Chen C, Umezū K, Kolodner RD. Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae* rfa1 mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Mol Cell* 1998;2:9-22.
24. Hass CS, Gakhar L, Wold MS. Functional Characterization of a Cancer Causing Mutation in Human Replication Protein A. *Mol Cancer Res* 2010;8:1017-26.
25. Yuesheng Z, Yongdong Y, Binglong B et al. The silencing of replication protein A1 induced cell apoptosis via regulating Caspase 3. *Life Sci* 2018;201:141-9.
26. Bélanger F, Fortier E, Dubé M et al. Replication protein A availability during DNA replication stress is a major determinant of cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2018;78:5561-73.
27. Patrick SM, Turchi JJ. Human replication protein A preferentially binds cisplatin-damaged duplex DNA in vitro. *Biochemistry* 1998; 37:8808-15.
28. Neher TM, Bodenmiller D, Fitch RW, Jalaal SI, Turchi JJ. Novel irreversible small molecule inhibitors of replication protein A display single-agent activity and synergize with cisplatin. *Mol Cancer Ther* 2011;10:1796-806.



## Βιβλιογραφία

1. Nikolaos Givalos, Hariklia Gakiopoulou, Melina Skliri, Katerina Bousboukea, Anastasia E Konstantinidou, Penelope Korkolopoulou, Maria Lelouda, Gregory Kouraklis, Efstratios Patsouris and Gabriel Karatzas **Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer**, *Modern Pathology* (2007) 20, 159–166
2. Dimitrios Kanakis, Georgia Levidou, Hariklia Gakiopoulou, Christos Eftichiadis, Irene Thymara, Paraskevi Fragkou, Eleni-Andriana Trigka, Efsthios Boviatsis, Efstratios Patsouris, Penelope Korkolopoulou **Replication protein A: a reliable biologic marker of prognostic and therapeutic value in human astrocytic tumors**, *Human Pathology* (2011) 42, 1545–1553
3. Sarah C. Shuck and John J. Turchi. **Targeted Inhibition of Replication Protein A Reveals Cytotoxic Activity, Synergy with Chemotherapeutic DNA-Damaging Agents, and Insight into Cellular Function.** *Cancer Res* 2010; 70:3189-3198
4. Karen M. Vasquez, Jesper Christensen, Lei Li, Rick A. Finch, and Peter M. Glazer. **Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions.** 5848–5853, *PNAS* April 30, 2002, vol. 99, no. 9
5. Georgia Levidou, Hariklia Gakiopoulou, Nikolaos Kavantzias, Angelica A. Saetta, Maria Karlou, Petros Pavlopoulos, Irene Thymara, Kalliopi Diamantopoulou, Efstratios Patsouris and Penelope Korkolopoulou, **Prognostic significance of replication protein A (RPA) expression levels in bladder urothelial carcinoma.** 2010 *BJU INTERNATIONAL*, 108, E59–E65
6. Czyzewska J., Guzinska-Ustymowicz K., Lebelt A., Zalewski B., Kemova A. **Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers** . Vol 49, 2004 Suppl. 1, Proceedings.
7. G. Schluter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, M. H. G. Becker, G. Key, H. Flad, J. Gerdes. **The cell proliferation- associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new**

- kind of cell cycle- maintaining proteins.** The Journal of Cell Biology (1993), 123:513-522.
8. N. Yabuki, H. Sasano, K. Kato, S. Ohara, T. Toyota, H. Nagura, M. Miyaike, N. Nozaki, A. Kikuchi. **Immunohistochemical study of DNA Topoisomerase II in human gastric disorders.** American Journal of Pathology (1996), 149:997-1007.
  9. M. Agostino, J. Rino, J. Braga, F. Ferreira, S. Steffensen, J. Ferreira. **Human Topoisomerase IIa: Targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis.** Published in 2004 as 10. 1091/ mbc. E03-08-0558.
  10. Yasuhiko Kitadai. **Angiogenesis and lymph angiogenesis of gastric cancer.** Journal of Oncology (2010), Article ID 468725, 8 pages.
  11. Stanley R. Hamilton/ Lauri A. Aaltonen  
**Pathology and genetics of tumors of the digestive system** (IARC Press Lyon, 2000), Chapter 3: Tumors of the stomach
  12. De Vita Jr VT, Hellmann S., Rosenberg AS, editors.  
**Cancer principles and practice of oncology.**(Chapter 39: Cancers of the gastrointestinal tract / Section 3: Cancer of the stomach).
  13. Λυδία Νακοπούλου  
**Ανοσοϊστοχημεία: Μοριακοί δείκτες στη διαγνωστική παθολογική ανατομική και στην πρόγνωση των κακοήθων νεοπλασμάτων.**(Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης)
  14. Α.Χ. Μαργαρίτης και συνεργάτες  
**Κυτταρική Βιολογία** (Εκδόσεις Λίτσας)
  15. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. Annu Rev Biochem. 1997; 66:61-92.
  16. Iftode C, Daniely Y, Borowiec JA. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1999; 34:141-180.
  17. Kim HS1, Brill SJ. Rfc4 interacts with Rpa1 and is required for both DNA replication and DNA damage checkpoints in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol. 2001; 21:3725-3737.

18. Dodson GE, Shi Y, Tibbetts RS. DNA replication defects, spontaneous DNA damage, and ATM-dependent checkpoint activation in replication protein A-deficient cells. *J Biol Chem*. 2004; 279:34010-34014.
19. Fanning E, Klimovich V, Nager AR. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34:4126-4137.
20. Erdile LF, Heyer WD, Kolodner R, et al. Characterization of a cDNA encoding the 70-kDa single-stranded DNA-binding subunit of human replication protein A and the role of the protein in DNA replication. *J Biol Chem* 1991; 266:12090–12098.
21. Erdile LF, Wold MS, Kelly TJ. The primary structure of the 32-kDa subunit of human replication protein A. *J Biol Chem* 1990; 265:3177–3182.
22. Umbricht CB, Griffin CA, Hawkins AL, Grzeschik KH, O'Connell P, Leach R, et al. High-resolution genomic mapping of the three human replication protein A genes (RPA1, RPA2, and RPA3). *Genomics*. 1994; 20:249-257.
23. Givalos N, Gakiopoulou H, Skliri M, Bousboukea K, Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, et al. Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer. *Mod Pathol*. 2007; 20:159-166.
24. Levidou G, Gakiopoulou H, Kavantzias N, Saetta AA, Karlou M, Pavlopoulos P, et al. Prognostic significance of replication protein A (RPA) expression levels in bladder urothelial carcinoma. *BJU Int*. 2011; (2 Pt 2):E59-65.
25. Levidou G, Ventouri K, Nonni A, Gakiopoulou H, Bamias A, Sotiropoulou M, et al. Replication protein A in non early ovarian adenocarcinomas: correlation with MCM-2, MCM-5, Ki-67 index and prognostic significance. *Int J Gynecol Pathol*. 2012; 31:319-327.

26. Kanakis D, Levidou G, Gakiopoulou H, Eftichiadis C, Thymara I, Fragkou P, et al. Replication protein A: a reliable biologic marker of prognostic and therapeutic value in human astrocytic tumors. *Hum Pathol.* 2011; 42:1545-1553.
27. Dahai Y, Sanyuan S, Hong L, Di Z, Chong Z. A relationship between replication protein A and occurrence and prognosis of esophageal carcinoma. *Cell Biochem Biophys.* 2013; 67:175-180.
28. Xiao W, Zheng J, Zhou B, Pan L. Replication Protein A 3 Is Associated with Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis and Poor Patient Survival. *Dig Dis.* 2018; 36:26-32.
29. Zou Z, Ni M, Zhang J, Chen Y, Ma H, Qian S, et al. miR-30a can inhibit DNA replication by targeting RPA1 thus slowing cancer cell proliferation. *Biochem J.* 2016; 473:2131-2139.
30. Dai Z, Wang S, Zhang W, Yang Y. Elevated Expression of RPA3 Is Involved in Gastric Cancer Tumorigenesis and Associated with Poor Patient Survival. *Dig Dis Sci.* 2017; 62:2369-2375.
31. Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2015; 15:276–289.
32. Glanzer JG, Liu S, Wang L, Mosel A, Peng A, Oakley GG. RPA Inhibition Increases Replication Stress and Suppresses Tumor Growth. *Cancer Res.* 2014; 74:5165-5172.
33. Wang J, Yang T, Chen H, Li H, Zheng S. Oncogene RPA1 promotes proliferation of hepatocellular carcinoma via CDK4/Cyclin-D pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 498:424-430.
34. Casasola SV, Colunga M J M, Millán O A, Rodríguez J M M. Pronostic value of clinicopathologic factors Ki67, cyclin D1, cyclin D3 and CDK4 in gastric carcinoma. *Oncología,* 2004; 27:537-543.

35. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell Reports* 2018; 24:1105–1112.
36. Zou Y, Liu Y, Wu X, Shell SM. Functions of Human Replication Protein A (RPA): From DNA Replication to DNA Damage and Stress Responses. *J Cell Physiol.* 2006; 208:267–273.
37. Chen C, Umezu K, Kolodner RD. Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae* rfa1 mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Mol Cell* 1998; 2:9–22
38. Hass CS, Gakhar L, Wold MS. Functional Characterization of a Cancer Causing Mutation in Human Replication Protein A. *Mol Cancer Res* 2010;8:1017–1026.
39. Yuesheng Z, Yongdong Y, Binglong B, Liyi L, Tao Y, Weijian S, et al. The silencing of replication protein A1 induced cell apoptosis via regulating Caspase 3. *Life Sciences* 2018; 201:141-149.
40. Bélanger F, Fortier E, Dubé M, Lemay J-F, Buisson R, Masson J-Y, et al. Replication protein A availability during DNA replication stress is a major determinant of cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2018; 78:5561-5573.
41. Patrick SM, Turchi. Human replication protein A preferentially binds cisplatin-damaged duplex DNA in vitro. *Biochemistry* 1998; 37:8808-8815.
42. Neher TM, Bodenmiller D, Fitch RW, Jalal SI, Turchi JJ. Novel irreversible small molecule inhibitors of replication protein A display single-agent activity and synergize with cisplatin. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10:1796–806.