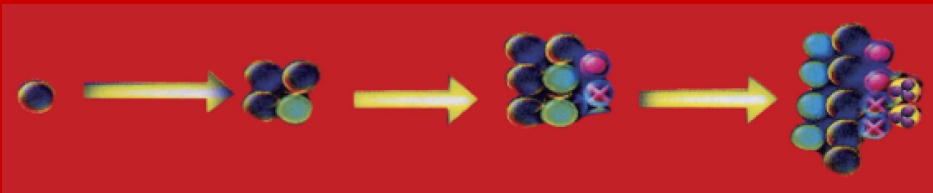


ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΟΛΗΨΙΣ

- **ΕΠΙΣΗΜΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ – Ε.Ε.Π.Ο.**
- **OFFICIAL JOURNAL OF THE HELLENIC SOCIETY OF PREVENTIVE ONCOLOGY – HE.SO.P.O.**



Ε.Ε.Π.Ο.

- **Φυσικά φυτοχημικά εργαστήρια – ένα φυσικό φυτοχημικό εργαστήριο μπορεί να εκπροσωπηθεί επάξια από το δέντρο ροδιά**
Editorial: Π. Β. Γκινόπουλος
- **Η παθοβιοχημεία της αθηρογένεσης στον Σακχαρώδη Διαβήτη και στην υπερλιπιδαιμία**
Θ. Κουρέλης, Κ. Κουρέλης, Δ. Μπασιούκα, Μ. Κουτρούλη, Π. Κουτσαρά, Ε. Γκαμούλου, Α. Ακτύπη, Στ. Γιώτης, Σ. Ξυνόγαλος, Χ. Τσαγρή και Π. Γκινόπουλος
- **Πρόληψη και πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού**
Ε. Γ. Λιβιεράτος
- **Η επιτυχία στην πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου πρέπει να διανύει τα μέσα μαζικής δικτύωσης τα οποία μεγιστοποιούν το αποτέλεσμα**
Π. Γκινόπουλος, Ι. Σταράκης, Φ. Καρβελάς, Π. Πατρικάκος, Χ. Τσαγρή
- **Η μοριακή αιτιοπαθογένεια και διαγνωστική του σαρκώματος EWING'S**
Θ. Κουρέλης, Κ. Κουρέλης, Δ. Μπασιούκα, Μ. Κουτρούλη, Π. Κουτσαρά, Ε. Γκαμούλου, Α. Ακτύπη, Στ. Γιώτης, Σ. Ξυνόγαλος, Χ. Τσαγρή και Π. Γκινόπουλος
- **Διαγνωστική και χειρουργική προσέγγιση του πρώιμου καρκίνου μαστού**
Φ. Καρβελάς, Π. Πατρικάκος, Π. Δημητρίου, Α. Τσαμπασβίλι, Ν. Λαζούρκο
- **Κόσμος...Ελλάδα...Δορυφορικά**

ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΟΛΗΨΙΣ
Επίσημο περιοδικό της
Ελληνικής Εταιρείας Προληπτικής
Ογκολογίας – Ε.Ε.Π.Ο.

Διοικητικό Συμβούλιο Ε.Ε.Π.Ο.

Πρόεδρος: Παναγιώτης Β. Γκινόπουλος
Αντιπρόεδρος: Παντελής Κοκκινόπουλος
Ταμίας: Μιχαήλ Κουράτος
Μέλη: Μαρία Κρητικού
Κωνσταντίνα Θεοδωροπούλου

Εκδότης: Ελληνική Εταιρεία Προληπτικής Ογκολογίας
Διευθυντής Σύνταξης: Παναγιώτης Β. Γκινόπουλος
Αναπληρωτής: Γεώργιος Σαμέλης
Γενικός Γραμματέας: Βασίλειος Αλιβιζάτος
Σύμβουλος Έκδοσης: Ανδρέας Μαζαράκης
Καλλιτεχνική Διεύθυνση, Γραμματειακή υποστήριξη & Marketing: Τσαγρή Χαραλαμπία
Επιμέλεια Άρθρων: Μαρίνα Παναγιωτοπούλου

Συντακτική Επιτροπή

Αγγελάκης Χρήστος
Αλιβιζάτος Βασίλειος
Αποστολόπουλος Νικόλαος
Γιαννιός Ιωάννης
Γκιάφης Αναστάσιος
Γώγος Χαράλαμπος
Δημητριάδης Κωνσταντίνος
Δημόπουλος Μελέτιος – Αθανάσιος
Καμούτσης Χαράλαμπος
Καρβελάς Φώτιος
Λέντζας Ιωάννης
Μπαφαλούκος Δημήτριος
Μπασιάρης Χαράλαμπος
Μπόννας Απόστολος
Ξυδάκης Εμμανουήλ
Παπακωνσταντίνου Χρήστος
Παπαπολυχρονιάδης Κωνσταντίνος
Sacco Rosario
Sammarco Giuseppe
Σκρουμπής Γεώργιος
Σουλέρη Μαρία
Σταθόπουλος Γεώργιος
Σταράκης Ιωάννης
Teodossiu Giovanni
Φιλιώτης Νικόλαος

Επιστημονική – Συμβουλευτική Επιτροπή

Πρόεδρος: Κουρέλης Θεόδωρος
Αντιπρόεδρος: Γκινόπουλος Παναγιώτης
Βαρθαλίτης Ιωάννης
Γεωργακόπουλος Δημήτριος
Καρβελάς Φώτιος
Κοκκινόπουλος Παντελής
Σαμέλης Γεώργιος
Triggiani Edoardo

Διεύθυνση για αλληλογραφία – Γραμματεία

Ηρώων Πολυτεχνείου 104 & Τερτσέτη, Πάτρα, Τ.Κ. 26442
Τηλ. Επικοινωνίας: 2610-431465, 6977-559518
email: drginop@otenet.gr, site: www.cancerprevention.gr
Επιμέλεια έκδοσης: Ε.Ε.Π.Ο.

CANCER PREVENTION
Official Journal of the
Hellenic Society of Preventive
Oncology – HE.SO.P.O.

Board of the HE.SO.P.O.

President: Panagiotis V. Ginopoulos
Vice President: Pantelis Kokkinopoulos
Treasurer: Michael Kouratos
Members: Kritikou Maria
Theodoropoulou Konstantina

Publisher: Hellenic Society of Preventive Oncology
Editor in Chief: Panagiotis V. Ginopoulos
Associate Editor: George Samelis
Secretary: Vasileios Alivizatos
Editor Consultant: Andreas Mazarakis
Art Director, Secretary & Marketing: Tsagri Charalampia
Editing of articles: Marina Panagiotopoulou

Editorial Board

Agelakis Christos
Alivizatos Vasileios
Apostolopoulos Nikolaos
Giannios Ioannis
Giaffis Anastasios
Gogos Charalambos
Dimitriadis Konstantinos
Dimpoulos Meletios – Athanasios
Kamoutsis Charalambos
Karvelas Fotios
Lentzas Ioannis
Bafaloukos Dimitrios
Basiaris Charalambos
Bonas Apostolos
Xidakis Emanouil
Papakonstantinou Christos
Papapolychroniadis Konstantinos
Sacco Rosario
Sammarco Gueseppe
Skroubis Georgios
Sougleri Maria
Stathopoulos Georgios
Starakis Ioannis
Teodossiu Giovanni
Filiotis Nikolaos

Scientific – Consultative Committee

President: Kourelis Theodoros
Vice President : Ginopoulos Panagiotis
Varthalitis Ioannis
Georgakopoulos Dimitrios
Karvelas Fotios
Kokkinopoulos Pantelis
Samelis Georgios
Triggiani Edoardo

Διαχείριση καταχωρήσεων:

E.T.S. Events & Travel Solutions A.E.,
Ελ. Βενιζέλου 154, 17122 Ν. Σμύρνη,
Τηλ.: 210 98 80 032, Fax: 210 98 81 303
E-mail: ets@otenet.gr, ets@events.gr, site:www.events.gr

3

Editorial

Φυσικά φυτοχημικά εργαστήρια -ένα φυσικό φυτοχημικό εργαστήριο μπορεί να εκπροσωπηθεί επάξια από το δέντρο ροδιά

Π. Β. Γκινόπουλος

8

Κόσμος...Ελλάδα...Δορυφορικά

Άρθρα – Ανασκοπήσεις

15

Η παθοβιοχημεία της αθηρογένεσης στον Σακχαρώδη Διαβήτη και στην υπερλιπιδαιμία

Θ. Κουρέλης, Κ. Κουρέλης, Δ. Μπασσιούκα, Μ. Κουτρούλη, Π. Κουτσιαρά, Ε. Γκαμούλου, Α. Ακτύπη, Στ. Γιώτης, Σ. Ξυνόγαλος, Χ. Τσαγρή και Π. Γκινόπουλος

23

Πρόληψη και πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού

Ε. Γ. Λιβιεράτος

32

Η επιτυχία στην πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου πρέπει να διανύει τα μέσα μαζικής δικτύωσης τα οποία μεγιστοποιούν το αποτέλεσμα

Π. Γκινόπουλος, Ι. Σταράκης, Φ. Καρβελάς, Π. Πατρικάκος, Χ. Τσαγρή

39

Η μοριακή αιτιοπαθογένεια και διαγνωστική του σαρκώματος EWING'S

Θ. Κουρέλης, Κ. Κουρέλης, Δ. Μπασσιούκα, Μ. Κουτρούλη, Π. Κουτσιαρά, Ε. Γκαμούλου, Α. Ακτύπη, Στ. Γιώτης, Σ. Ξυνόγαλος, Χ. Τσαγρή και Π. Γκινόπουλος

76

Διαγνωστική και χειρουργική προσέγγιση του πρώιμου καρκίνου μαστού

Φ. Καρβελάς, Π. Πατρικάκος, Π. Δημητρίου, Α. Τσαμπασβίλι, Ν. Λαζούρκο

81

Οδηγίες για τους συγγραφείς

3

Editorial

Natural phytochemical laboratories – Pomegranate can be an equal representative

P. V. Ginopoulos

8

World...Greece...Satellite

Articles – Reviews

15

Pathobiochemistry of athero-genesis in diabetes mellitus and hypelipidemia

Th. Kourelis, K. Kourelis, D. Basiouka, M. Koutrouli, P. Koutsiara, E. Gamoulou, A. Aktypi, St. Giotis, S. Xinogalos, Ch. Tsagri and P. Ginopoulos

23

Prevention and previous diagnosis of breast cancer

H. G. Livieratos

32

Success of cancer prevention and control should be pursued through social media which can maximize the results

P. Ginopoulos, I. Starakis, F. Karvelas, P. Patrikakos, Ch. Tsagri

39

The molecular basis in the aetiology and diagnosis of ewing's sarcoma

Th. Kourelis, K. Kourelis, D. Basiouka, M. Koutrouli, P. Koutsiara, E. Gamoulou, A. Aktypi, St. Giotis, S. Xinogalos, Ch. Tsagri and P. Ginopoulos

76

Diagnostic and surgical approach of primary breast cancer

F. Karvelas, P. Patrikakos, P. Dimitriou, A. Tsabasvili, N. Lazourko

81

Instructions to authors



Editorial

Φυσικά φυτοχημικά εργαστήρια - ένα φυσικό φυτοχημικό εργαστήριο μπορεί να εκπροσωπηθεί επάξια από το δέντρο ροδιά

Panagiotis V. Ginopoulos, MD, PhD

Clinical Oncologist

Chairman of Clinical Oncology Department

General Hospital of Patras

President of the Hellenic Society of Preventive Oncology

Natural phytochemical laboratories – Pomegranate can be an equal representative

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια ανεξέλεγκτης αύξησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και συνήθως θεωρείται μια ασθένεια γενετικής προέλευσης. Η έρευνα κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχει διαπιστώσει πέρα από κάθε αμφιβολία ότι διάφοροι επιγενετικοί/περιβαλλοντικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση αλλά και στην μεταστατική ιδιότητα του καρκίνου. Χωρίς συγκεκριμένες αιτίες και με διάφορους παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση οινοπνεύματος, η κακή διατροφή και η παχυσαρκία κλπ., ο καρκίνος είναι ευρέως αποδεκτός ως ασθένεια του υιοθετημένου από τον καθένα μας μοντέλου ζωής και έκφρασής της.

Σχεδόν 1.685.210 νέες περιπτώσεις καρκίνου καταγράφηκαν το 2016 μόνο στις ΗΠΑ και περίπου 595.690 άνθρωποι αναμένεται να πεθάνουν από καρκίνο στο μέλλον. Παρά τη σημαντική πρόοδο των θεραπευτικών επιλογών, η επίπτωση και η θνησιμότητα του καρκίνου συνεχίζει να έχει αυξητικές τάσεις. Ωστόσο, αναμένεται ότι θα υπάρξουν

περίπου 20 εκατομμύρια ασθενείς με καρκίνο έως το έτος 2025. Ως εκ τούτου, η προσοχή επικεντρώνεται στην πρόληψη ως τελική στρατηγική για τη διαχείριση του καρκίνου. Σήμερα εκτιμάται ότι τα δύο τρίτα των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο θα μπορούσαν να είχαν αποφευχθεί με την αλλαγή του τρόπου ζωής, κυρίως μέσω των διατροφικών συνηθειών.

Πριν από σχεδόν 2500 χρόνια, ο Ιπποκράτης αναγνώρισε τη σημασία του φαγητού για τη γενική υγεία. Ουσίες προερχόμενες από τις καλλιέργειες δεδομένων φυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη και την θεραπεία πολλαπλών νοσηρών οντοτήτων, στηρίζοντας έτσι την από αιώνων πλατιά θεμελιωμένη κοινωνική συνείδηση δηλαδή την δυνατότητα που έχουν οι φυσικοί παράγοντες, που είναι γνωστοί ως φυτοχημικά / φυσικά χημειοθεραπευτικά. Τη δεδομένη χρονική στιγμή, σχεδόν το 47% των διαθέσιμων αντικαρκινικών φαρμάκων στην αγορά είναι παράγωγα φυσικών προϊόντων ή αντίγραφα αυτών.

Υπάρχουν πολλά επιστημονικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η καθημερινή κατανάλωση

μιας διατροφής πλούσιας σε φρούτα και λαχανικά μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια σημαντικό ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στις φυτικές τροφές που περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις. Οι αναφορές υποδηλώνουν ότι, εκτός από το 5% - 10% όλων των περιπτώσεων καρκίνου, το υπόλοιπο 90%-95% προκαλείται από το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής. Μέχρι στιγμής, σχεδόν 25.000 διαφορετικά φυτοχημικά έχουν αναγνωρισθεί σε φρούτα και λαχανικά που έχουν τεράστιες αντικαρκινικές ιδιότητες. Αυτά τα φυτοχημικά είναι μη τοξικά (στερούνται παρενεργειών – τοξικότητας) και γενικά στοχεύουν πολλαπλές οδούς σηματοδότησης.

Το ρόδι (*Punica granatum L.*) παράγεται από ένα φυλλοβόλο δέντρο που ανήκει στην οικογένεια των *Lythraceae*. Υπάρχουν αναφορές που υποδεικνύουν ότι αρχικά ανακαλύφθηκε από το Ιράν και ότι καλλιεργήθηκε από την περιοχή της Μεσογείου και τη Βόρεια Ινδία από την αρχαιότητα. Σήμερα, καλλιεργείται στη Βόρεια Αφρική και την τροπική Αφρική, τη Βόρεια και Νότια Αμερική αλλά και στην Ευρώπη τόσο για την καλλιέργεια των φρούτων της όσο και ως διακοσμητικό δέντρο. Το φρούτο ροδιού είναι στρογγυλεμένο μούρο με παχύ κοκκινωπό δέρμα που καλύπτει περίπου 200-1400 λευκούς έως βαθύ κόκκινους ή μωβ σπόρους. Οι σπόροι ροδιού είναι βρώσιμοι και έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε υδρολύμενες τανίνες και ανθοκυανίνες. Σε σύγκριση με την αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E, του καροτενίου και του ασκορβικού οξέος, τα αντιοξειδωτικά του ροδιού φαίνονται μοναδικά λόγω συνδυασμών μιας ευρείας σειράς πολυφαινολών που έχουν ευρύτερο φάσμα δράσης κατά διάφορων τύπων ελεύθερων ριζών. Σε σύγκριση με τα αναγνωρισμένα αντιοξειδωτικά στο κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι, οι ανθοκυανές

από φρούτα ροδιού έχουν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Το ρόδι έχει χρησιμοποιηθεί σαν βάση για την θεραπεία πολλών ασθενειών και παθήσεων. Στο αρχαίο ινδικό ιατρικό σύστημα, δηλαδή στην ιατρική της Αγιουρβέδα, το ρόδι θεωρήθηκε ως ένα ολόκληρο φαρμακείο από μόνο του. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ως αντιπαρασιτικό φάρμακο και για τη θεραπεία της διάρροιας και των ελκών. Το σύστημα ιατρικής Unani, ένα άλλο παραδοσιακό σύστημα ιατρικής, αναγνωρίζει τη σημασία του ροδιού στη θεραπεία του διαβήτη. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες του ροδιού έχουν προκαλέσει σημαντικό ενδιαφέρον στη σημερινή επιστημονική κοινότητα, όπως αποδεικνύεται από την επιστημονική έρευνα σχετικά με τα οφέλη του ροδιού για την υγεία που έχουν δημοσιευθεί τις τελευταίες δεκαετίες.

Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν είναι μόνο το ίδιο το φρούτο του ροδιού, αλλά και τα υπόλοιπα μέρη του φυτού, όπως ο φλοιός, τα φύλλα καθώς και οι ρίζες του δέντρου του ροδιού, που είναι πλούσια σε μοριακά συστατικά με θεραπευτικές ιδιότητες. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ρόδι και τα συστατικά του μπορούν να επηρεάσουν αποτελεσματικά πολλαπλές οδούς σηματοδότησης που εμπλέκονται στη φλεγμονή, τον κυτταρικό μετασχηματισμό, τον υπερπολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την καρκινογένεση και τέλος την αναστολή των τελικών σταδίων της καρκινικής μετάλλαξης αλλά και της ίδιας της μεταστατικής ιδιότητας. Τα συστατικά του ροδιού φαίνεται ότι ρυθμίζουν παράγοντες μεταγραφής, προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, μόρια ρυθμιστικού κυτταρικού κύκλου, πρωτεϊνικές κινάσες, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές, και καταστέλλουν τους παράγοντες ανάπτυξης σε διάφορους καρκίνους. Στον παρακάτω πίνακα ενδεικτικά βλέπουμε ορισμένες από τις πολλαπλές δυνατότητες των μοριακών στοχεύσεων του ροδιού στις νεοπλασίες.

Table 1. Molecular targets of pomegranate in cancers.

Cancers	Molecular Mechanism(s)/Cellular Targets
	Inhibits UVB-mediated activation of MAPK, NFκB and STAT3 signaling pathways
	Inhibits UVA-mediated phosphorylation of STAT3, AKT, ERK1/2, mTOR and p70S6K Decreases UVA-mediated upregulation of PCNA and Ki-67 expression Up-regulates UVA-mediated Bax and Bad expression
	Inhibits UVB-mediated decrease in GSH Inhibits UVB-mediated up-regulation of MMPs-1,-2,-7 and -9
Skin	Inhibits UVB-induced DNA damage and NFκB activation
	Inhibits UVB-induced DNA damage Inhibits UVB-induced MMP-2 and -9 activities Decreases UVB-induced MMPs-2,-3,-9 expression Inhibits UVB-induced c-Jun phosphorylation and tropoelastin protein expression Reduces UVB-mediated PCNA, ODC and COX-2 expression Augments UVB-mediated increase in p53 and p21 expression
	Inhibits TPA-mediated increase in epidermal ODC activity and COX-2 expression Inhibits TPA-induced MAPK phosphorylation and NFκB activation
	Exhibits anti-estrogenic and anti-aromatase activities
	Downregulates estrogen responsive genes
Breast	Reduces VEGF and pro-inflammatory cytokines/chemokines
	Downregulates expression of genes involved in DNA damage response and repair
	Regulates TGF-β/Smads pathway
	Disrupts ER and Wnt/β-catenin signaling pathways
Prostate	Decreases serum PSA levels
	Inhibits STAT3 phosphorylation and NFκB activation
	Inhibits IGF-1/AKT/mTOR signaling
	Inhibits androgen biosynthesis enzymes such as 5α-reductase type I and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase type II
	Inhibits CYP1B enzyme activity/expression
Lung	Increases p21 and p27 protein expression Downregulates cyclins/cdks, PCNA and Ki-67 expression Inhibits MAPK, PI3K/AKT and NFκB signaling pathways
	Inhibits DNA adduct formation
	Decreases markers of proliferation, inflammation and angiogenesis Inhibits phosphorylation of MAPK and c-Met
	Decreases lipid peroxidation and increases total antioxidant capacity levels
Colon	Inhibits COX-2 expression, AKT phosphorylation and NFκB DNA binding activity
	Increases hepatic GST activity Modulates miR-646, miR-1249, miR-135b-5p, miR-135b-3p, miR-92b-5p, miR-765, miR-496, miR-181c-3p and miR-18a-3p

REFERENCES

- Afaq, F.; Malik, A.; Syed, D.; Maes, D.; Matsui, M.S.; Mukhtar, H. Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* 2005, 81, 38-45.
- Zaid, M.A.; Afaq, F.; Syed, D.N.; Dreher, M.; Mukhtar, H. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochem. Photobiol.* 2007, 83, 882–888.
- Khan, N.; Syed, D.N.; Pal, H.C.; Mukhtar, H.; Afaq, F. Pomegranate fruit extract inhibits UVB-induced inflammation and proliferation by modulating NF-κB and MAPK signaling pathways in mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 2012, 88, 1126–1134.
- Afaq, F.; Zaid, M.; Khan, N.; Syed, D.N.; Yun, J.-M.; Sarfaraz, S.; Suh, Y.; Mukhtar, H. Inhibitory effect of oral feeding of pomegranate fruit extract on UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2008, 49, 1246.
- Syed, D.N.; Malik, A.; Hadi, N.; Sarfaraz, S.; Afaq, F.; Mukhtar, H. Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of

- cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* 2006, 82, 398–405.
6. Baccarin, T.; Mitjans, M.; Ramos, D.; Lemos-Senna, E.; Vinardell, M.P. Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. *J. Photochem. Photobiol. B* 2015, 153, 127–136.
7. Pacheco-Palencia, L.A.; Noratto, G.; Hingorani, L.; Talcott, S.T.; Mertens-Talcott, S.U. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 8434–8441.
8. Afaq, F.; Zaid, M.A.; Khan, N.; Dreher, M.; Mukhtar, H. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Exp. Dermatol.* 2009, 18, 553–561.
9. Afaq, F.; Khan, N.; Syed, D.N.; Mukhtar, H. Oral feeding of pomegranate fruit extract inhibits early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. *Photochem. Photobiol.* 2010, 86, 1318–1326.
10. Afaq, F.; Saleem, M.; Krueger, C.G.; Reed, J.D.; Mukhtar, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer* 2005, 113, 423–433.
11. Hora, J.J.; Maydew, E.R.; Lansky, E.P.; Dwivedi, C. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. *J. Med. Food* 2003, 6, 157–161.
12. Adams, L.S.; Zhang, Y.; Seeram, N.P.; Heber, D.; Chen, S. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev. Res.* 2010, 3, 108–113.
13. Sreeja, S.; Santhosh Kumar, T.R.; Lakshmi, B.S. Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. *J. Nutr. Biochem.* 2012, 23, 725–732.
14. Ocha, A.; Wang, L.; Penichet, M.; Martins-Green, M. Pomegranate juice and specific components inhibit cell and molecular processes critical for metastasis of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012, 136, 647–658.
15. Grossmann, M.E.; Mizuno, N.K.; Schuster, T.; Cleary, M.P. Punicic acid is an omega-5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *Int. J. Oncol.* 2010, 36, 421–426.
16. Dikmen, M.; Ozturk, N.; Ozturk, Y. The antioxidant potency of *Punica granatum* L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *J. Med. Food* 2011, 14, 1638–1646.
17. Costantini, S.; Rusolo, F.; de Vito, V.; Moccia, S.; Picariello, G.; Capone, F.; Guerriero, E.; Castello, G.; Volpe, M.G. Potential anti-inflammatory effects of the hydrophilic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil on breast cancer cell lines. *Molecules* 2014, 19, 8644–8660.
18. Shirode, A.B.; Kovvuru, P.; Chittur, S.V.; Henning, S.M.; Heber, D.; Reliene, R. Antiproliferative effects of pomegranate extraction MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. *Mol. Carcinog.* 2014, 53, 458–470.
19. Chen, H.S.; Bai, M.H.; Zhang, T.; Li, G.D.; Liu, M. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF-beta/Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* 2015, 46, 1730–1738.
20. Mandal, A.; Bishayee, A. Mechanism of Breast Cancer Preventive Action of Pomegranate: Disruption of Estrogen Receptor and Wnt/beta-Catenin Signaling Pathways. *Molecules* 2015, 20, 22315–22328.
21. Malik, A.; Afaq, F.; Sarfaraz, S.; Adhami, V.M.; Syed, D.N.; Mukhtar, H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 14813–14818.
22. Wang, Y.; Zhang, S.; Iqbal, S.; Chen, Z.; Wang, X.; Wang, Y.A.; Liu, D.; Bai, K.; Ritenour, C.; Kucuk, O.; et al. Pomegranate extract inhibits the bone metastatic growth of human prostate cancer cells and

- enhances the in vivo efficacy of docetaxel chemotherapy. *Prostate* 2013, 74, 497–508.
23. Rettig, M.B.; Heber, D.; An, J.; Seeram, N.P.; Rao, J.Y.; Liu, H.; Klatte, T.; Belldegrun, A.; Moro, A.; Henning, S.M.; et al. Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Mol. Cancer Ther.* 2008, 7, 2662–2671.
24. Lee, S.T.; Wu, Y.L.; Chien, L.H.; Chen, S.T.; Tzeng, Y.K.; Wu, T.F. Proteomic exploration of the impacts of pomegranate fruit juice on the global gene expression of prostate cancer cell. *Proteomics* 2012, 12, 3251–3262.
25. Adhami, V.M.; Siddiqui, I.A.; Syed, D.N.; Lall, R.K.; Mukhtar, H. Oral infusion of pomegranate fruit extract inhibits prostate carcinogenesis in the TRAMP model. *Carcinogenesis* 2012, 33, 644–651.
26. Koyama, S.; Cobb, L.J.; Mehta, H.H.; Seeram, N.P.; Heber, D.; Pantuck, A.J.; Cohen, P. Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Horm. IGF Res.* 2010, 20, 55–62.
27. Hong, M.Y.; Seeram, N.P.; Heber, D. Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgensynthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *J. Nutr. Biochem.* 2008, 19, 848–855.
28. Kasimsetty, S.G.; Bialonska, D.; Reddy, M.K.; Thornton, C.; Willett, K.L.; Ferreira, D. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 10636–10644.
29. Khan, N.; Hadi, N.; Afaq, F.; Syed, D.N.; Kweon, M.H.; Mukhtar, H. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis* 2007, 28, 163–173.
30. Zahin, M.; Ahmad, I.; Gupta, R.C.; Aqil, F. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts. *Biomed. Res. Int.* 2014, 2014, 467465.
31. Khan, N.; Afaq, F.; Kweon, M.H.; Kim, K.; Mukhtar, H. Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res.* 2007, 67, 3475–3482.
32. Bachoual, R.; Talmoudi, W.; Boussetta, T.; Braut, F.; El-Benna, J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 1224–1228.
33. Husari, A.; Khayat, A.; Bitar, H.; Hashem, Y.; Rizkallah, A.; Zaatari, G.; El Sabban, M. Antioxidant activity of pomegranate juice reduces acute lung injury secondary to hyperoxia in an animal model. *BMC Res. Notes* 2014, 7, 664.
34. Selimoglu Sen, H.; Sen, V.; Bozkurt, M.; Turkcu, G.; Guzel, A.; Sezgi, C.; Abakay, O.; Kaplan, I. Carvacrol and pomegranate extract in treating methotrexate-induced lung oxidative injury in rats. *Med. Sci. Monit.* 2014, 20, 1983–1990.
35. Adams, L.S.; Seeram, N.P.; Aggarwal, B.B.; Takada, Y.; Sand, D.; Heber, D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 980–985.
36. Boateng, J.; Verghese, M.; Shackelford, L.; Walker, L.T.; Khatiwada, J.; Ogutu, S.; Williams, D.S.; Jones, J.; Guyton, M.; Asiamah, D.; et al. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45, 725–732.
37. Nunez-Sanchez, M.A.; Davalos, A.; Gonzalez-Sarrias, A.; Casas-Agustench, P.; Visioli, F.; Monedero-Saiz, T.; Garcia-Talavera, N.V.; Gomez-Sanchez, M.B.; Sanchez-Alvarez, C.; Garcia-Albert, A.M.; et al. MicroRNAs expression in normal and malignant colon tissues as biomarkers of colorectal cancer and in response to pomegranate extracts consumption: Critical issues to discern between modulatory effects and potential artefacts. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59, 1973–1986.

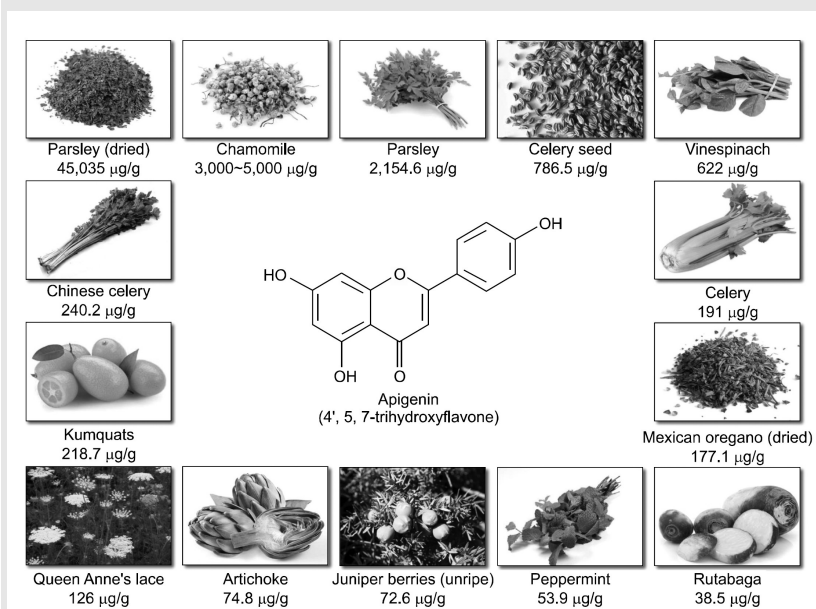


Π. Γκινόπουλος, Θ. Κουρέλης, Π. Απαλίδης, Σ. Κοκκινόπουλος,
Τ. Κοκκινόπουλος, Χ. Τσαγρή

Τμήμα Κλινικής Ογκολογίας Γενικού Νοσοκομείου Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»
Ελληνική Εταιρεία Προληπτικής Ογκολογίας - ΕΕΠΟ

Φλαβονοειδή με προεξάρχουσα την απιγενίνη – παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην καρκινογένεση αλλά και στην ίδια την θεραπευτική προσέγγιση των νεοπλασιών

Τα φλαβονοειδή (ή τα βιοφλαβονοειδή) είναι μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών φυτών και μυκήτων. Ανακαλύφθηκαν στη δεκαετία του 1930 από τον Ούγγρο βιοχημικό Rusznyák και Szent-Györgyi. Απομόνωσαν μια ουσία από το φλοιό των εσπεριδοειδών, την οποία ονόμασαν κιτρίνη ή βιταμίνη Ρ, η οποία περιείχε ένα μείγμα από φλαβονοειδή. Αργότερα, η βιταμίνη Ρ μετονομάστηκε σε φλαβονοειδή. Από την ανακάλυψη αυτή, οι επιστήμονες έχουν εντοπίσει περισσότερα από 7.000 φλαβονοειδή και ο κατάλογος των φλαβονοειδών που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα συνεχίζει να αυξάνεται.



Structure and natural sources of apigenin. Data from US Department of Agriculture

και το μοριακό βάρος είναι MW 270,24, ακόμα είναι κίτρινη κρυσταλλική σκόνη αδιάλυτη στο νερό και διαλυτή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο και θερμή αιθανόλη.

Η απιγενίνη θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα φλαβονοειδή λόγω της παρουσίας και της αφθονίας της σε μια ποικιλία φυσικών πηγών, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων και των λαχανικών. Σημαντικές πηγές απιγενίνης περιλαμβάνουν το μαϊντανό, το χαμομήλι, το σέλινο, το vinespinach (κοινός αντράκλα), οι αγκινάρες και η ρίγανη. Μεταξύ αυτών, ο ξηρός μαϊντανός είναι η πλουσιότερη πηγή της απιγενίνης, που περιέχει 45,035 µg/g. Άλλες πηγές υψηλής περιεκτικότητας σε απιγενίνη είναι το χαμομήλι (αποξηραμένο λουλούδι), ο σπόρος σέλινου, το vinespinach (κοινός αντράκλα) και το κινέζικο σέλινο, που περιέχουν 3.000-5.000 µg/g, 786.5 µg/g, 622 µg/g και 240.2 µg/g αντίστοιχα. Εκτός από την απιγενίνη, έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές διάφορα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα (π.χ., απινίνη και arigenin) και διμερή της απιγενίνης όπως η αμνητοφλαβόνη (3', 8''- biapigenin).

Στη δεκαετία του 1980, οι Birt et al. αρχικά κατέδειξαν τις αποτελεσματικές αντι-μεταλλαξιογόνες και αντι-προληπτικές ιδιότητες της απιγενίνης. Από τότε, η πιθανή αξία της απιγενίνης στην

Η ένωση 4', 5, 7-τριυδροξυφλαβόνη είναι μια φυσική φλαβόνη που συνήθως αναφέρεται ως απιγενίνη. Το όνομα "arigenin", όπως πολλά άλλα φλαβονοειδή, προέρχεται από το γένος *Arium* στο *Ariaceae* (σέλινο, καρότο ή μαϊντανό, γνωστό και ως *Umbelliferae*). Η ένωση έχει ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις C-5 και C-7 του A-δακτυλίου και C-4 του B-δακτυλίου και ανήκει σε μια τάξη φλαβονοειδών γνωστών ως φλαβόνες. Ο μοριακός τύπος της απιγενίνης είναι C₁₅H₁₀O₅

πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου υποστηρίχθηκε περαιτέρω από εκτεταμένη έρευνα σε διάφορα ζωικά μοντέλα καρκίνου.

Η χημειοπροφυλακτική επίδραση της απιγενίνης διερευνήθηκε σε τουλάχιστον δέκα in vivo μελέτες, οι οποίες εξέταζαν τις δόσεις, τις οδούς χορήγησης και τις συχνότητες θεραπείας της απιγενίνης. Η από του στόματος χορήγηση της απιγενίνης (20 και 50mg/ποντίκια) για 20 εβδομάδες μείωσε το μέγεθος των όγκων και προκάλεσε την πλήρη ύφεση των μεταστάσεων σε απομακρυσμένα όργανα στο διαγονιδιακό αδενοκαρκίνωμα ενός μοντέλου προστάτη ποντικού (TRAMP). Αυτή η επίδραση αποδόθηκε στην καταστολή της οδού σηματοδότησης O-υποδοχέα φωσφοϊνοσιτιδίου 3-κινάσης (PI3K)/Akt/Forkhead. Η ίδια ομάδα έρευνας απέδειξε επίσης ότι η απιγενίνη κατέστειλε αποτελεσματικά την πρόοδο του καρκίνου του προστάτη σε ποντικούς TRAMP προκαλώντας μείωση της δράσης του insulin – like growth factor (IGF)-I/IGF και αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης. Επιπλέον, μια περίοδο 15 εβδομάδων από του στόματος χορήγησης απιγενίνης (2,5mg/kg) σε χάμστερ οδήγησε σε μείωση του μεγέθους και της επίπτωσης του όγκου, ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, απόπτωση, φλεγμονή, δείκτες αγγειογένεσης καθώς και σε διαμόρφωση των φάσης I και II πτώσεων της αποτοξίνωσης σε μοντέλο πειραματικής καρκινογένεσης που προκαλείται από το 7,12-διμεθυλο βενζ [α] ανθρακένιο (7, 12-dimethyl benz[a] anthracene-DMBA).

Η χημειοπροστατευτική επίδραση της απιγενίνης κατά της στοματικής καρκινογένεσης υποστηρίχθηκε περαιτέρω από μελέτες που αναφέρουν ότι αυτή η φλαβόνη ελαττώνει την επίπτωση του όγκου στο μοντέλο ζώων που προκαλείται από DMBA. Οι Wei et al. ερεύνησαν τα πιθανά χημειοπροφυλακτικά αποτελέσματα της απιγενίνης στην ογκογένεση του δέρματος ποντικού που ξεκίνησε με DMBA και προωθήθηκε από οξεικό 12-O-δεκατετρανοϋλοφοβόλης-13 σε ποντίκια SENCAR. Τα ευρήματά τους αποκάλυψαν ότι η τοπική εφαρμογή της απιγενίνης (5 & 20μmol) έχει ως αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση της εμφάνισης και του αριθμού των θηλωμάτων καθώς και των καρκινωμάτων.

Μία μελέτη από τους Byun et al. έδειξε μείωση τόσο του επαγόμενου από UVB οιδήματος αυτιού όσο και της έκφρασης COX-2 φλεγμονώδους μεσολαβητή στο δέρμα του SKH-1 άτριχου ποντικού, που αντικατοπτρίζει την ισχυρή χημειοπροφυλακτική δραστηριότητα της απιγενίνης έναντι της επαγόμενης από UVB φλεγμονής του δέρματος. Μία τοπική εφαρμογή της απιγενίνης (5 μM) πριν από την έκθεση σε UVB εξασθένησε την έκφραση COX-2 και τον επαγόμενο παράγοντα από υποξία (HIF)-1α, τους σημαντικούς μεσολαβητές αγγειογένεσης, μέσω διαμόρφωσης HuR και θρομβοσπονδίνης-1. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η απιγενίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση του επαγόμενου από UVB στόχου ραπαμυκίνης των θηλαστικών (mTOR), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου σε δέρμα ποντικού. Η ίδια μελέτη έδειξε επίσης ότι η απιγενίνη αναστέλλει την επαγόμενη από UVB σηματοδότηση του mTOR κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της AMP - ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK), αντί της καταστολής του Akt, ακόμη και αν η επαγόμενη από UVB ενεργοποίηση του mTOR οδηγείται από σηματοδότηση PI3K / Akt και είναι ικανή να εμποδίσει τη φωσφορυλίωση / ενεργοποίηση.

Η εκτίμηση της χημειοπροφυλακτικής δράσης της απιγενίνης σε ένα κυτταρικό μοντέλο καρκινογένεσης κόλουν σε αρουραίους έδειξε ότι η διαιτητική πρόσληψη αυτής της φλαβόνης (0,1%) προκάλεσε την απόπτωση των αρχόμενων παγκρεατικών καρκινικών βλαβών με αποτέλεσμα τη μείωση της καρκινογένεσης και την περαιτέρω μείωση της ανάπτυξης εστιών των πρώτων φάσεων της εξέλιξης των νεοπλασμάτων, την ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου του παχέος εντέρου, ιδιαίτερα στη φάση έναρξης του όγκου. Στο ίδιο μοντέλο, οι υποδόριες ενέσεις απιγενίνης (0,75 & 1,5mg/kg σωματικού βάρους) μείωσαν σημαντικά την επίπτωση της περιτοναϊκής μετάστασης εντερικών αδενοκαρκινωμάτων. Ομοίως, στους APC^{Min/+} ποντικούς, η από του στόματος χορήγηση της απιγενίνης μείωσε τον αριθμό των πολυπόδων με την ενεργοποίηση του p53, ενός γονιδίου καταστολής του όγκου. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν το ευεργετικό αποτέλεσμα της απιγενίνης έναντι της καρκινογένεσης που προκαλείται από χημικά και μετάλλαξη.

Πολλά in vivo παραδείγματα έχουν δείξει ότι η απιγενίνη μπορεί να καταστείλει την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Η από του στόματος χορήγηση της απιγενίνης (20 και 50mg/ποντίκια) μείωσε τον όγκο και το υγρό βάρος των όγκων σε γυμνούς ποντικούς που έφεραν καρκίνο του προστάτη στον άνθρωπο, χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες. Η πρόσληψη απιγενίνης μειώνει

επίσης το επίπεδο IGF-I στον ορό και προκαλεί απόπτωση και διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε ξενομόσχευμα όγκου. Η απιγενίνη έδειξε ότι διακόπτει τις οδούς σηματοδότησης NF-κΒ, οι οποίοι ήταν υπεύθυνοι για την καταστολή της προόδου του καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον, η απιγενίνη μείωσε σημαντικά το επίπεδο της Her2/neu, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα, γεγονός που έδειξε μείωση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου του μαστού στα ποντίκια που έλαβαν απιγενίνη.

Η απιγενίνη εμφάνισε επίσης σημαντική αντινεοπλασματική δράση σε κύτταρα ανθρώπινου παχέος εντέρου εμφυτευμένου σε γυμνά ποντίκια. Η αντιμεταστατική δράση της απιγενίνης έχει επίσης αναφερθεί σε ορθοτοπικό ορθοκολικό μοντέλο γυμνών ποντικών. Η θεραπεία με απιγενίνη σε ποντίκια που φέρουν ξενομοσχεύματα καρκίνου του πνεύμονα A549 μείωσε το μέγεθος του όγκου. Αυτό αποδόθηκε εν μέρει στη διακοπή της οδού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα HIF-1α-αγγείων και στην επακόλουθη καταστολή της αγγειογένεσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ομοίως, η πρόσληψη απιγενίνης στη δίαιτα (0,2%) για έξι εβδομάδες προκάλεσε σημαντική αντικαρκινική δράση σε ορθοτοπικά ανθρώπινο παγκρεατικό καρκίνο εμφυτευμένο σε μοντέλο γυμνού ποντικού. Συνολικά, η πλειοψηφία αυτών των μελετών δείχνει ότι η απιγενίνη μπορεί να αναστείλει την έναρξη του όγκου, την εξέλιξη και μετάσταση σε μια ευρεία ποικιλία προκλινικών μοντέλων καρκίνου.

J Cancer Prev 2016; 21:216-226

Αποτελεί το ελαιόλαδο εκτός από φυσικό και οικονομικό παράγοντα των αγροτικών περιοχών και μέσον πρόληψης και θεραπείας του καρκίνου;



Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το ελαιόλαδο ασκεί προστατευτική επίδραση έναντι ορισμένων κακοηθών όγκων (μαστού, προστάτη, ενδομητρίου, πεπτικού συστήματος).

Ορισμένες ερευνητικές μελέτες κατέδειξαν ότι το ελαιόλαδο μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η κατανάλωση υγιεινής διατροφής με το ελαιόλαδο ως κύρια πηγή λίπους θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την εμφάνιση καρκίνου. Ο λόγος είναι ότι οι κυτταρικές μεταλλάξεις που προκαλούνται από τον καρκίνο οφείλονται εν μέρει σε τοξίνες οι οποίες, όταν καταναλώνονται μέσω της διατροφής, προσβάλλουν το DNA. Κατά τη διέλευση από το ήπαρ, αυτές οι τοξίνες παράγουν ελεύθερες ρίζες που στη

συνέχεια επιτίθενται στο DNA. Για την καταπολέμηση αυτών των ελεύθερων ριζών, το σώμα χρειάζεται βιταμίνες και αντιοξειδωτικά όπως αυτά που περιέχονται στο ελαιόλαδο.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι μια πλούσια σε ελαιόλαδο δίαιτα συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του εντέρου. Η προστατευτική επίδραση του ελαιολάδου είναι ανεξάρτητα από την ποσότητα φρούτων και λαχανικών που καταναλώνεται στη διατροφή.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ελαιόλαδο παρέχει προστασία από τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τελευταία, η έρευνα έχει εξετάσει τις μεταβολικές επιπτώσεις των λιπών, ειδικότερα τον προστατευτικό ρόλο του ελαιολάδου στη χρόνια ηπατική νόσο και στη νόσο του γαστρεντερικού γνωστή ως νόσο του Crohn. Τα αποτελέσματα φαίνονται ευεργετικά, ιδιαίτερα σε χρήση ελαιολάδου σε προκαρκινικές αλλοιώσεις. Μετά την ανάλυση τριών ειδών διατροφής, οι ερευνητές κατέληξαν σε διάφορα συμπεράσματα. Η διατροφή του ελαιολάδου μείωσε τον αριθμό των καρκινικών αλλοιώσεων, ο αριθμός των όγκων που αναπτύχθηκαν ήταν σαφώς και σημαντικά χαμηλός, και οι όγκοι ήταν λιγότερο επιθετικοί και είχαν καλύτερη πρόγνωση.

Αυτό το ευεργετικό αποτέλεσμα θα μπορούσε να σχετίζεται με το ελαϊκό οξύ, το κυρίαρχο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ στο ελαιόλαδο. Έχει παρατηρηθεί ότι αυτό το λιπαρό οξύ μειώνει την παραγωγή προσταγλανδινών προερχόμενων από αραχιδονικό οξύ, το οποίο με τη σειρά του παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και την ανάπτυξη όγκων.

Ωστόσο, δεν αποκλείεται ότι άλλα συστατικά του ελαιολάδου, όπως τα αντιοξειδωτικά, τα φλαβονοειδή, οι πολυφαινόλες και το σκουαλένιο, μπορεί επίσης να έχουν θετική επίδραση. Το

σκουαλένιο πιστεύεται ότι έχει ευνοϊκή επίδραση στο δέρμα μειώνοντας τη συχνότητα των μελανωμάτων.

Το ελαιόλαδο προσθέτει επίσης στη γεύση των λαχανικών και των όσπριων, τα οφέλη των οποίων έχουν αποδειχθεί επαρκώς στην πρόληψη του καρκίνου.

Μερικές πολύ ελπιδοφόρες, τρέχουσες έρευνες επικεντρώνονται στην προστασία που παρέχεται από το ελαιόλαδο κατά της παιδικής λευχαιμίας και διάφορων μορφών καρκίνου, όπως ο καρκίνος των οισοφαγικών πλακωδών κυττάρων.

www.internationaloliveoil.org

Η φλούδα του ροδιού και η ενεργός δράση της στην πρόληψη και στη θεραπεία όλων των μορφών του καρκίνου του βρογχικού επιθηλίου



Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο παγκοσμίως. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, εκτιμάται ότι 224.390 νέες περιπτώσεις και 158.080 θάνατοι προκλήθηκαν από καρκίνο του πνεύμονος και στα δύο φύλα στις ΗΠΑ κατά το έτος 2016. Η τρέχουσα έρευνα έχει τεκμηριώσει τη δυνατότητα του εκχυλίσματος από το ρόδι (pomegranate fruit extract – PFE) στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα. Η θεραπεία με PFE είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιωσιμότητας

των A549 κυττάρων ανθρώπινου καρκινώματος πνεύμονα, αλλά είχε ελάχιστες επιδράσεις στα φυσιολογικά ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα A549 τα οποία υποβλήθηκαν σε διάλυμα με PFE παρουσίασαν εξαρτώμενη από τη δόση δέσμευση κυττάρων στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου, η οποία συνδέθηκε με την επαγωγή των WAF1/p21 και KIP1/p27 και μια μείωση στην έκφραση κυκλίνης και cdk. Επιπλέον, η θεραπεία με PFE αναστέλλει αρκετές οδούς σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των MAPK, PI3K/AKT και NFκB.

Χρησιμοποιώντας την πανικαλιγίνη (punicalagin) που απομονώθηκε από το φλοιό του ροδιού, οι Aqil et al. έδειξαν ότι η πανικαλιγίνη διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση μειώνοντας τη συσσώρευση οξειδωτικών προϊόντων DNA και παρουσιάζει ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική δράση κατά των κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα. Η πανικαλιγίνη και το ελλαγικό οξύ (ellagic acid), τα κυριότερα συστατικά της φλούδας του ροδιού, αποδείχθηκαν ότι έχουν ισχυρές αντι-πολλαπλασιαστικές δραστηριότητες. Και οι δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα A549 και H1299 εμφάνισαν συγκρίσιμα επίπεδα ευαισθησίας στις εξεταζόμενες ενώσεις.

Μια πρόσφατη μελέτη αξιολόγησε τις αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες του φλοιού του ροδιού έναντι διαφορετικών καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες του ροδιού δεν περιορίζονται αποκλειστικά στο βρώσιμο μέρος του φρούτου ροδιού. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα από τα φύλλα του ροδιού (PLE) μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυτταρικών γραμμών καρκινώματος μη μικροκυτταρικού πνεύμονα (A549, H1299) και κυτταρικής σειράς LL/2 πνευμονικού καρκινώματος Lewis ποντικού. Η θεραπεία με PLE μείωσε τη μετάσταση και την διήθηση των κυττάρων H1299, υποδεικνύοντας τη χρησιμότητα του PLE στη μείωση των μεταστάσεων.

Η χημειοπροφυλακτική αποτελεσματικότητα του PFE αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας B(a)P (benzo(a)pyrene) και N-νιτροζο-τρις-χλωροαιθυλουρίας (NTCU) προκαλώντας μοντέλα όγκου πνεύμονα του A/J ποντικών. Διαπιστώθηκε ότι σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου που εκτέθηκαν σε B(a)P και NTCU, τα ποντίκια που έλαβαν PFE σε πόσιμο νερό είχαν στατιστικά σημαντικές ελαχιστοποιήσεις ποικιλομορφιών καρκινώματος του πνεύμονα. Οι ποντικοί που υποβλήθηκαν σε αγωγή με PFE εμφάνισαν μειωμένη ενεργοποίηση των οδών NFκB, MAPK και PI3K που οδήγησε σε μειωμένο πολλαπλασιασμό κυττάρων και αγγειογένεση στους πνεύμονες ποντικών που υποβλήθηκαν σε αγωγή με B(a)P και NTCU. Μια άλλη μελέτη αποκάλυψε ότι η από του στόματος χορήγηση PFE στο πόσιμο νερό μείωσε την ανάπτυξη όγκου σε αθυμικούς γυμνούς ποντικούς που τους εμφυτεύτηκαν κύτταρα A549. Η πανικαλιγίνη και το ελλαγικό οξύ έδειξαν ισχυρές αντι-

μεταλλαξιόγones και αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις στο μοντέλο καρκίνου του πνεύμονα που προκαλείται από Β(α)Ρ. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες υποδεικνύουν τη χρησιμότητα του ΡΡΕ ως χημειοπροφυλακτικό/χημειοθεραπευτικό παράγοντα κατά του καρκίνου του πνεύμονα στον άνθρωπο. Το υδατικό εκχύλισμα αποφλοιωμένου ροδιού αξιολογήθηκε για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και βρέθηκε ότι ανέστειλε τη δράση της ουδετερόφιλης μυελοϋπεροξειδάσης (ΜΡΟ). Αν και δεν έδειξε καμία επίδραση στην παραγωγή υπεροξειδίου, εξασθένησε την προκαλούμενη από λιποπολυσακχαρίτη πνευμονική φλεγμονή σε ποντικούς. Η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της ΜΡΟ με υδατικό εκχύλισμα ροδιού μπορεί να αποδοθεί στην αντιφλεγμονώδη δράση της.

Ομοίως, οι Husari et al. εξέτασαν την αντιοξειδωτική δράση του χυμού του ροδιού (pomegranate juice – ΡJ) σε απόκριση υπεροξίας και παρατήρησαν ότι οι αρουραίοι που εκτέθηκαν σε υπεροξία εμφάνισαν αυξημένη παραγωγή ROS και αυξημένα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1 & IL-6) στους πνεύμονες. Η χορήγηση του ΡJ στο πόσιμο νερό είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική εξασθένηση αυτών των επιδράσεων της υπεροξίας, υποδηλώνοντας έτσι ότι το ΡJ διαθέτει ισχυρές αντιφλεγμονώδεις δράσεις εκτός από το ότι έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το ΡΡΕ διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε αρουραίους που έλαβαν μεθοτρεξάτη. Οι αρουραίοι που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μεθοτρεξάτη παρουσίασαν σημαντική αύξηση των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης, ολικής οξειδωτικής κατάστασης και δείκτη οξειδωτικού στρες στον ορό και στους πνεύμονες. Ωστόσο, η προεπεξεργασία των αρουραίων με ΡΡΕ αντέστρεψε αυτά τα αποτελέσματα.

Η παραπάνω ουσιαστική διαφοροποίηση της δράσης της φλούδας του ροδιού και του χυμού του στην πρόληψη και την θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα μας θυμίζει την υψηλή παθολογία του πληθυσμού της Κίνας από την στιγμή που υιοθέτησαν να καταναλώνουν αποφλοιωμένο ρύζι συνέπεια της πολιτισμικής τους εξέλιξης. Δεδομένου ότι και εμείς δεν χρησιμοποιούμε με κανένα τρόπο προς βρώση τον φλοιό του ροδιού.

Molecules 2017, 22,177;doi:10.3390/molecules22010177

Εκχύλισμα δενδρολίβανου και η δράση του σε μηχανισμούς απόπτωσης καρκινικών κυττάρων αλλά και παράκαμψη χημειοανθεκτικότητας

Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) είναι ένα δημοφιλές καρύκευμα που χρησιμοποιείται ευρέως στις δυτικές δίαιτες, ειδικά στη «μεσογειακή διατροφή», η οποία έδειξε προληπτικά αποτελέσματα καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη και διαφόρων συμπαγών όγκων. Το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη και η ροσμανολόλη είναι τα ενεργά συστατικά που περιέχονται στο δενδρολίβανο και φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την αντικαρκινική δράση του.

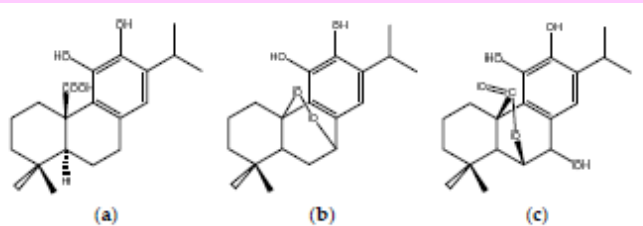


Figure 8. Structures of carnosic acid (a); carnosol (b) and rosmanol (c).

Το εκχύλισμα δενδρολίβανου από μόνο του ή σε συνδυασμό με σπάνια χημειοθεραπευτικό παράγοντα (5-FU) δρα ως ενισχυτικό στην αποτελεσματικότητα της δράσης της. Δηλαδή καταδείχθηκε ουσιαστική παράκαμψη της χημειοανθεκτικότητας των κυττάρων που παρουσιάζουν αντίσταση στην 5-FU από μόνη της ή με

προσθήκη από το εκχύλισμα δενδρολίβανου που προσέθεσε αυτόματα την ευαισθησία των ανθεκτικών κυττάρων που παρουσιάστηκαν σε μόνη την 5-FU.

Επίσης η καρνοσόλη προκαλεί απόπτωση σε πολλαπλούς άλλους τύπους κυττάρων από μόνη της. Επίσης το δεδομένο εκχύλισμα δενδρολίβανου προκάλεσε αντικαρκινική δράση κατά του καρκίνου του μαστού και ιδιαίτερα σε αυτά που φέρουν υποδοχείς ορμονών και υποδοχείς γονιδίου Βcl-2 που ως γνωστόν προσδίδουν πολύ ανθεκτική ιδιότητα αντίστασης στα διάφορα θεραπευτικά φάρμακα του καρκίνου του μαστού. Τα ίδια γεγονότα παρατηρήθηκαν και στα ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του ήπατος, νεφρού και προστάτη.

Επίσης το καρνοσικό οξύ είναι σε θέση να ενεργοποιεί αυτοφαγικούς κυτταρικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος βλέπε πολυμορφοπύρρηνο και λεμφοκύτταρα. Όπως επίσης το

ίδιο φαινόμενο αυτοφαγίας μπορεί να επαναληφθεί και από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα (κανιβαλισμός). Με την περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων και φυσικών ιδιοτήτων των καρυκευμάτων φαίνεται ότι μπορούμε να ανακαλύψουμε και νέους μηχανισμούς και νέα μοντέλα εξουδετέρωσης των καρκινικών κυττάρων.

Cancer Lett. 2015, 367, 93–102

Πρόληψη του καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με παράγωγο της ελληνικής γης όπως η, ευρείας κατανάλωσης, ντομάτα μας

Είναι γνωστό ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες βρίσκονται σε υψηλότερο ρίσκο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αυξάνεται καθώς αυξάνεται και ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ). Ωστόσο, η διατροφή σε αυτήν την κατηγορία των γυναικών παίζει καθοριστικό ρόλο.



Νεότερα δεδομένα μελετών υποδεικνύουν ότι η υιοθέτηση διατροφής πλούσιας σε ντομάτες μπορεί να μειώσει το ρίσκο. Δυστυχώς όμως, οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι οποίες κινδυνεύουν να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού, στερούνται πρακτικών προληπτικών μεθόδων για τη μείωση του κινδύνου τους. Μια πιθανή στρατηγική λοιπόν θα μπορούσε να είναι μέσω διαιτητικών τροποποιήσεων.

Τα δεδομένα της μελέτης που δημοσιεύθηκαν στο *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, η οποία διεξήχθη στο Ohio State University Comprehensive Cancer Center έδειξαν ότι η αύξηση της διατροφικής κατανάλωσης τροφίμων με βάση την τομάτα μπορεί να αυξήσει ευνοϊκά τις συγκεντρώσεις της αδιπονεκτίνης στον ορό μεταξύ των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών σε αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα σε εκείνες που δεν ήταν παχύσαρκες. Η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων λίπους και του σακχάρου του αίματος.

Στην μελέτη συμμετείχαν 70 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Ο μέσος δείκτης ηλικίας και σωματικής μάζας των συμμετεχόντων ήταν 57,2 έτη και 30,0kg/m² αντίστοιχα. Οι παρεμβάσεις περιελάμβαναν 10 εβδομάδες κατανάλωσης μιας διατροφής με βάση τη ντομάτα (≥25 mg λυκοπενίου ημερησίως) και 10 εβδομάδες κατανάλωσης μιας διατροφής με βάση τη σόγια (≥40 g πρωτεΐνης σόγιας καθημερινά), με διαλείμματα διάρκειας 2 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν οι γυναίκες ακολουθούσαν τη διατροφή με τη ντομάτα, παρουσίαζαν αύξηση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης κατά 9%. Η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων λίπους και του σακχάρου του αίματος. Η επίδραση δε αυτή ήταν πιο εμφανής στις γυναίκες με χαμηλότερο ΔΜΣ. Αντίθετα, η διατροφή με τη σόγια οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης. Τα χαμηλά επίπεδα της σχετίζονται με αυξημένο ρίσκο παχυσαρκίας και ανθεκτικότητας στην ινσουλίνη.

Οι υπεύθυνοι σχολιάζουν ότι τα ευρήματά τους υποδεικνύουν ξεκάθαρα τα οφέλη της κατανάλωσης υψηλής ποσότητας ντομάτας και προϊόντων της ακόμα και σε μικρό χρονικό διάστημα. Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, τα οποία είναι πλούσια σε αναγκαία διατροφικά στοιχεία, βιταμίνες και ανόργανες ουσίες και φυτοχημικά όπως η λυκοπέννη, επιφέρει σημαντικά οφέλη. Πιστεύουν δε ότι η τακτική κατανάλωση τουλάχιστον της προταθείσας ημερήσιας ποσότητας φρούτων και λαχανικών θα προάγει την πρόληψη του καρκίνου του μαστού σε πληθυσμό με ρίσκο. Επίσης, υπογραμμίζουν τη σημασία της πρόληψης της παχυσαρκίας, αφού η διατροφή πλούσια σε ντομάτα είχε μεγαλύτερη επίδραση στα επίπεδα της αδιπονεκτίνης στις γυναίκες με υγιές σωματικό βάρος.

www.aicr.org/foods-that-fight-cancer/tomatoes.html

Η κατανάλωση της ελληνικής μαύρης σταφίδας είναι ίσως ο μοναδικός μέχρι τώρα γνωστός προληπτικός παράγων έναντι της ηπατικής καρκινογένεσης



Η μαύρη σταφίδα (*Ribes nigrum* L.) καταναλώνεται ευρέως και είναι γνωστό ότι διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε ανθοκυανίνες (250mg/100g φρέσκων φρούτων), οι οποίες έχουν προταθεί ότι έχουν δραστικές αντικαρκινικές ιδιότητες.

Χρησιμοποιώντας κύτταρα HepG2, μια *in vitro* μελέτη διαπίστωσε ότι το πλούσιο σε ανθοκυανίνη κομμάτι της μαύρης σταφίδας αναστέλλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε σύγκριση με άλλα μέρη,

το εκχύλισμα δέρματος μαύρης σταφίδας (BCSE) ήταν η καλύτερη πηγή ανθοκυανίνης με κυανιδινο-3-Ο-ρουτινοσίδη ως κυρίαρχο. Σε ένα μοντέλο χημικώς επαγόμενου καρκίνου του ήπατος σε αρουραίου, η χορήγηση διατροφής με BCSE (100 ή 500mg/kg για 22 εβδομάδες) προκαλούσε καταστολή της καρκινογένεσης.

Το BCSE επίσης ελαττώνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας κυκλοοξυγενάσης-2 (HSP70 και HSP90). Η μηχανιστική μελέτη έδωσε ουσιαστικά στοιχεία ότι η αναστολή της φλεγμονώδους δράσης μέσω της διαμόρφωσης της οδού σηματοδότησης NF-κB και η καταστολή του οξειδωτικού στρες μέσω ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης Nrf2 θα μπορούσαν να συμβάλουν στις προληπτικές ιδιότητες των βιοδραστικών συστατικών της μαύρης σταφίδας έναντι της ηπατοκαρκινογένεσης που προκαλείται από τη διαιθυλο νιτροζαμίνη.

Παρομοίως, σε ένα μοντέλου καρκίνου αρουραίου δύο φάσεων διεγερμένο με διαιθυλο νιτροζαμίνη και προωθημένο με φαινοβαρβιτάλη, το BCSE μείωσε την επίπτωση, τον συνολικό αριθμό, το μέγεθος και την πολλαπλότητα των προνεοπλασματικών ηπατικών οζιδίων κατά τρόπο που ανταποκρίνεται στην δόση. Περαιτέρω μελέτη αποκάλυψε ότι η προ-απόπτωση ενεργοποιήθηκε έντονα μέσω της αύξησης του Bax και ταυτόχρονα της καταστολής της έκφρασης Bcl-2 που εμπλέκονται πιθανώς σε αντικαρκινικά αποτελέσματα με τη μεσολάβηση του BCSE.

Nutrients 2016, 156; doi:10.3390/nu8030156

Η ΠΑΘΟΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ

PATHOBIOCHEMISTRY OF ATHEROGENESIS IN DIABETES MELLITUS AND HYPELIPIDEMIA

¹Θ. Κουρέλης, ²Κ. Κουρέλης, ³Δ. Μπασιούκα, ⁴Μ. Κουτρούλη, ¹Π. Κουτσιαρά, ¹Ε. Γκαμούλου, ⁵Α. Ακτύπη, ⁶Στ. Γιώτης, ⁷Σ. Ξυνόγαλος, ⁸Χ. Τσαγρή και ⁹Π. Γκινόπουλος

¹Th. Kourelis, ²K. Kourelis, ³D. Basiouka, ⁴M. Koutrouli, ¹P. Koutsiara, ¹E. Gamoulou, ⁵A. Aktypi, ⁶St. Giotis, ⁷S. Xinogalos, ⁸Ch. Tsagri and ⁹P. Ginopoulos

¹Μονάδα Παθολογικής Ογκολογίας, «Ολύμπιον Θεραπευτήριο» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.

¹Medical Oncology Unit, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.

²ΩτοΡινοΛαρυγγολογική Κλινική, «Καραμανδάνειο» Νοσοκομείο Παίδων Πατρών

²ENT Clinic, «Karamandaneio» Children Hospital of Patras

³Νευρολογική Κλινική, Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών

³Neurology Clinic, Peripheral University Hospital of Patras

⁴Τομέας Γενετικής Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

⁴Section of Cell Genetic Biology and Development, Biology Dept., University of Patras "St Andreas"

⁵Αιματολογική Κλινική, «Ολύμπιον Θεραπευτήριο» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.

⁵Clinical Hematology Clinic, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.

⁶Φαρμακείο, «Ολύμπιον Θεραπευτήριο» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.

⁶Pharmacy, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.

⁷Ειδικό Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Πειραιά «Μεταξά», Τομέας Παθολογικής Ογκολογίας

⁷Special Anticancer Hospital of Peiraus "Metaxa", Dept. of Medical Oncology

⁸Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ)

⁸Center for Disease Control & Prevention (HDCDP)

⁹ΜΧΜΘ-Ογκολογικό, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

⁹Dept of Clinical Oncology, General Hospital of Patras «St Andreas»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Βιοχημικά η αθηρογένεση συνίσταται στην επαγωγή και μακροχρόνια συντήρηση οξειδωτικής χημικής αντίδρασης στο υποενδοθηλιακό περιβάλλον ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και υπερλιπιδαιμία.

Το οξύδιο του αζώτου είναι η χημική ένωση που μπορεί να αναστείλει την αθηρογενετική διαδικασία και η αύξηση της ενεργότητας της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου αποτελεί ιδεώδη θεραπευτική κατεύθυνση.

Λέξεις κλειδιά: αθηρογένεση, σακχαρώδης διαβήτης, υπερλιπιδαιμία, οξύδιο του αζώτου

ABSTRACT

Early atherogenesis is characterized by the adherence of blood circulating monocytes to the endothelium, then by their migration to the sub-endothelial space, and further activation into monocyte-derived macrophages.

The primary documented driver of this process is oxidized lipoprotein particles within the wall, beneath the endothelial cells, though upper normal or elevated concentrations of blood glucose. Subsequently, Low Density Lipoprotein (LDL) particles in blood plasma invade the endothelium and become oxidized. Initial damage to the endothelium results in an inflammatory response.

In addition to these cellular activities, there is also smooth muscle proliferation and migration from the tunica media into the intima in response to cytokines secreted by damaged endothelial cells. This causes the formation of a fibrous capsule covering the fatty streak.



Intact endothelium can prevent this smooth muscle proliferation by releasing nitric oxide. Nitric oxide synthase upregulation represents an ideal therapeutic aim in the prevention of atherogenesis.

Keywords: atherogenesis, diabetes mellitus, hypelipidemia, nitric oxide

Η αθηρογένεση αποτελεί την πρώτη αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας στο Δυτικό κόσμο. Το παθολογοανατομικό γνώρισμα της αθηρογένεσης είναι το αθήρωμα ή η αθηρωματική πλάκα. Η δημιουργία, η επέκταση και η επιπλοκή της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί σε οξεία ή χρόνια μειωμένη παροχή αρτηριακού αίματος στα όργανα-στόχος που αρδεύονται από τις στενωμένες και αποφραγμένες αρτηρίες, με αποτέλεσμα την εμφάνιση νοσημάτων που οφείλονται στην ισχαιμία των οργάνων-στόχος. Τα πλέον συχνά νοσήματα που οφείλονται στην αθηρογένεση είναι ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος, η χρόνια ισχαιμική καρδιακή νόσος, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια, τα θρομβωτικά και αιμορραγικά αγγειακά εγκεφαλικά έμφρακτα, η ισχαιμία του γαστρεντερικού συστήματος από απόφραξη των μεσεντερίων αρτηριών, καθώς και η γάγγραινα των κάτω άκρων¹.

Η βασική παθολογοανατομική αλλοίωση της αθηρογένεσης, που είναι το αθήρωμα ή αλλιώς ινολιπώδης αθηρωματική πλάκα, μακροσκοπικά δίνει εικόνα εστιακής πλακώδους υπέγερσης εντός του έσω χιτώνα των αρτηριών. Το αθήρωμα μακροσκοπικά συνίσταται από ένα κεντρικό λιπιδιακό πυρήνα, αποτελούμενο κυρίως από χοληστερόλη και εστέρες χοληστερόλης, ο οποίος περιβάλλεται από ινώδη συνδετικό ιστό. Η μικροσκοπική εικόνα μας αποκαλύπτει ότι, κάθε αθηρωματική πλάκα, αποτελείται από τρία βασικά συστατικά: (1) κύτταρα, όπως λεία μυϊκά κύτταρα, μακροφάγα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, (2) εξωκυττάρια ουσία αποτελούμενη από συνδετικό ιστό, ινίδια κολλαγόνου, ελαστίνης και πρωτεογλυκάνες, και (3) ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια εναποθέσεις λιπιδίων. Η τυπική μικροσκοπική εικόνα της αθηρωματικής πλάκας περιλαμβάνει: (1) την επιτολής ινώδη καλύπτρα που αποτελείται

από λεία μυϊκά κύτταρα και λίγα λευκοκύτταρα καθώς και από άφθονο, σχετικά πυκνό, ινώδη συνδετικό ιστό, (2) μία κυτταροβριθή περιοχή, υπό την ινώδη καλύπτρα, που αναφέρεται ως "ώμος" της αθηρωματικής πλάκας και η οποία αποτελείται από T- λεμφοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα, και (3) τον εν τω βάθει νεκρωτικό πυρήνα ο οποίος είναι μία αποδιοργανωμένη μάζα λιπιδιακού υλικού αποτελούμενος από κρυστάλλους χοληστερόλης, κυτταρικά υπολείμματα, ινική και άλλες πρωτεΐνες πλάσματος, θρόμβους αιμοπεταλίων και ινικής σε διάφορα στάδια οργάνωσης, και πλούσια σε λιπίδια αφρώδη κύτταρα. Τα λιπίδια που περιέχονται εντός των αφρωδών κυττάρων είναι κυρίως ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη. Τα αφρώδη κύτταρα προέρχονται είτε από μονοκύτταρα της κυκλοφορίας τα οποία εξαγγειώθηκαν τοπικά και μετατράπηκαν σε ιστικά μακροφάγα, είτε από λεία μυϊκά κύτταρα του μέσου χιτώνα των αρτηριών. Η μεταμόρφωση των ιστικών μακροφάγων και των λείων μυϊκών ινών σε αφρώδη κύτταρα οφείλεται στην ενδοκυττάρια πρόσληψη λιπιδίων από τον εξωκυττάριο χώρο. Η επιπλεγμένη αθηρωματική πλάκα χαρακτηρίζεται επιπλέον από μακροσκοπική και μικροσκοπική αποτιάνωση λόγω εναπόθεσης αλάτων ασβεστίου καθώς και εστιακή επιφανειακή ρήξη και εξέλκωση η οποία προδιαθέτει στο σχηματισμό επικαθήμενου θρόμβου ινικής και αιμοπεταλίων¹.

Η τρέχουσα θεωρία σχετικά με την παθογένεια της αθηρογένεσης περιλαμβάνει μία αλληλουχία γεγονότων τα οποία ξεκινούν από τη βλάβη του ενδοθηλίου και οδηγούν στην τελική δημιουργία της επιπλεγμένης αθηρωματικής πλάκας. Πρόκειται για την υπόθεση της απάντησης στην βλάβη του ενδοθηλίου (response to injury hypothesis). Σύμφωνα με την θεωρία αυτή το πρωταρχικό βήμα που είναι απαραίτητο για την έναρξη των αλλοιώσεων της αθηροσκλήρυνσης είναι

κάποιας μορφής χημική ή μηχανική βλάβη στο αρτηριακό ενδοθήλιο. Η αρχική ενδοθηλιακή βλάβη θεωρείται ότι έχει τη μορφή ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ενός άθικτου ιστολογικά ενδοθηλίου και όχι απαραίτητα τη μορφή απογύμνωσης του έσω χιτώνα των αρτηριών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σαν απάντηση στην αρχική ενδοθηλιακή βλάβη, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται. Η χημική ή μηχανική βλάβη που εφαρμόζεται επί των ενδοθηλιακών κυττάρων πιθανά ενεργοποιεί την οικογένεια των NF-κΒ μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν με τη σειρά τους την έκφραση πλήθους επαγωγίμων γονιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου για τις πρωτεΐνες και τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, ο αυξημένος πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και η αυξημένη προσκόλληση των μονοκυττάρων και των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αυξημένη προσκόλληση των μονοκυττάρων και των αιμοπεταλίων διαμεσολαβείται από την αυξημένη έκφραση στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, μακρομοριακών υποδοχέων προσκόλλησης όπως, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) και EC-LAM (Endothelial Cell Leukocyte Adhesion Molecule).

Το επόμενο βήμα είναι τα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα να εισέλθουν και να μεταναστεύσουν στον υποενδοθηλιακό χώρο. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στον υποενδοθηλιακό χώρο και η επακόλουθη προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα μακρομόρια του υποενδοθηλιακού χώρου πυροδοτεί την ενεργοποίηση και την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση σεροτονίνης, ασβεστίου, επινεφρίνης, ADP, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), και θρομβοξάνης A₂ από τα άλφα κοκκία των αιμοπεταλίων. Η αποκοκκίωση και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία υποενδοθηλιακού αιμοπεταλιακού θρόμβου. Επιπλέον ο PDGF διεγείρει την μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσο χιτώνα των αρτηριών στον υποενδοθηλιακό χώρο και τον πολλαπλασιασμό αυτών των λείων μυϊκών

κυττάρων. Η είσοδος και η συσσώρευση των μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο πυροδοτείται από μία βαθμίδωση συγκεντρώσεως χημειοτακτικών παραγόντων, όπως οξειδωμένων λιπιδίων, τμημάτων πρωτεϊνών της εξοκυττάριας ουσίας ή φλεγμονωδών κυτταροκινών (MCP-1 monocyte chemotactic protein-1, M-CSF macrophage colony-stimulating factor) που παράγονται στον έσω χιτώνα των αρτηριών. Τα μονοκύτταρα που έχουν μεταναστεύσει στον υποενδοθηλιακό χώρο μετατρέπονται σε ιστικά μακροφάγα. Τα ιστικά μακροφάγα με τη σειρά τους παράγουν χημειοτακτικούς παράγοντες για την μετανάστευση λευκοκυττάρων όπως Leukotriene B₄, MCP-1 και M-CSF καθώς και παράγοντες που αυξάνουν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων όπως IL-1 και TNF. Επιπλέον τα ιστικά μακροφάγα παράγουν ελεύθερες τοξικές ρίζες οξυγόνου που προκαλούν τοπικά οξείδωση των LDL. Τέλος η παραγωγή PDGF, FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) και TGF-α (Transforming Growth Factor alpha) από τα ιστικά μακροφάγα διεγείρει με την σειρά της την μετανάστευση ινοβλαστών και λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσο χιτώνα στον υποενδοθηλιακό χώρο και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Τα ιστικά μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα του υποενδοθηλιακού χώρου πολλαπλασιάζονται και προσλαμβάνουν LDL και β-VLDL με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ελεύθερης και εστεροποιημένης χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων και να μεταμορφώνονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα ξεκινούν την δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας. Τα λεία μυϊκά κύτταρα που περιβάλλουν τα αφρώδη κύτταρα παράγουν κολλαγόνο, ελαστίνη και πρωτεογλυκάνες υποστηρίζοντας έτσι περαιτέρω και σταθεροποιώντας την αναπτυσσόμενη αθηρωματική πλάκα.

Η αθηρωματική πλάκα στη συνέχεια εξελίσσεται σε μία, ολοένα αυξανόμενη σε μέγεθος, επιπλεγμένη αποτιτανωμένη αλλοίωση που περιέχει στο εσωτερικό της λιπίδια, νεκρωμένα κύτταρα και ασβέστιο. Η εστιακή επιφανειακή διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας αποκαλύπτει τελικά υποενδοθηλιακά μόρια όπως πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο και εκθέτει τα μόρια

αυτά στα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια. Τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο υποενδοθηλιακό κολλαγόνο, καθώς και στις υποενδοθηλιακές πρωτεογλυκάνες που έχουν εκτεθεί στο σημείο της επιφανειακής βλάβης (ρήξης). Τα προσκολλημένα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και δημιουργούν θρόμβους επί της επιπλεγμένης αθηρωματικής πλάκας με τελικό αποτέλεσμα την στένωση του εύρους του αρτηριακού αυλού και την επακόλουθη ισχαιμία¹.

Η τρέχουσα λοιπόν υπόθεση, σχετικά με την παθογένεια της αθηρογένεσης, είναι να θεωρήσουμε την αθηρογένεση σαν μία χρόνια φλεγμονώδη απάντηση του αρτηριακού τοιχώματος σε μία ποικιλία εναρκτήριων πυροδοτικών συμβαμάτων, πολλά εκ των οποίων μπορεί να ξεκινήσουν ενωρίς στην διάρκεια της ζωής. Πολλαπλοί παθογενετικοί μηχανισμοί συνεισφέρουν στην δημιουργία και στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας, όπως ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μονοκυτταρική προσκόλληση και διήθηση, πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών ινών, εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, συσσώρευση λιπιδίων και θρόμβωση. Ανάμεσα στα εναρκτήρια πυροδοτικά συμβάματα περιλαμβάνονται η υπερλιπιδαιμία και η υπεργλυκαιμία (σακχαρώδης διαβήτης)¹.

Η υπερλιπιδαιμία (υπερχοληστερολαιμία και υπερτριγλυκεριδαίμια), καθώς και ο σακχαρώδης διαβήτης συγκαταλέγονται ανάμεσα στους μείζονες παράγοντες κινδύνου που ευθύνονται για την δημιουργία και την επέκταση της αθηρογένεσης. Οι παθοβιοχημικοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων, τόσο η υπερλιπιδαιμία όσο και ο σακχαρώδης διαβήτης, πυροδοτούν την διαδικασία της αθηρογένεσης, αποτελούν αντικείμενο εντατικής βασικής έρευνας καθώς η διαλεύκανση της παθοβιοχημείας της αθηρογένεσης αναμένεται να οδηγήσει στο σχεδιασμό φαρμάκων ικανών να αναστείλουν την επέκταση ή και τη δημιουργία των αθηρωμάτων. Έχοντας περιγράψει την παθογενετική θεωρία της αθηρογένεσης, θα επιχειρήσουμε στη συνέχεια να εστιάσουμε τους μηχανισμούς μέσα από τους οποίους τόσο η υπερλιπιδαιμία όσο και ο σακχαρώδης διαβήτης προωθούν την εξέλιξη της αθηρογένεσης².

Η υπερλιπιδαιμία έχει χαρακτηριστεί σαν αιτία πρόκλησης πρωταρχικής ενδοθηλιακής βλάβης. Υψηλά κυκλοφορούντα εξωκυττάρια επίπεδα LDL και πιθανά β-VLDL έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσληψη LDL και β-VLDL από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αυξημένη αυτή πρόσληψη θεωρείται ότι οδηγεί σε αρχική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, πιθανά μέσω ενεργοποίησης της οικογένειας των NF-κΒ μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι πυροδοτούν την μεταγραφή επαγωγίμων γονιδίων εντός των ενδοθηλιακών κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση VCAM-1, ICAM-1 και EC-LAM στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και την επακόλουθη προσκόλληση μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αυξημένη έκφραση VCAM-1 και EC-LAM στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει τεκμηριωθεί σε πειραματικά μοντέλα υπερλιπιδαιμίας. Τα κύτταρα τα οποία απαρτίζουν την αθηρωματική πλάκα έχουν μετατραπεί σε αφρώδη κύτταρα επειδή έχουν αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ουδέτερων λιπιδίων με την μορφή τριγλυκεριδίων, καθώς και αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση εστεροποιημένης χοληστερόλης. Η προσαγωγή τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης από το λεπτό έντερο και το ήπαρ προς τους περιφερικούς ιστούς, γίνεται ως γνωστόν με τις LDL και β-VLDL λιποπρωτεΐνες, ενώ η απαγωγή τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς προς το ήπαρ γίνεται με τις HDL λιποπρωτεΐνες.

Θεωρώντας το σύνολο των κυττάρων τα οποία απαρτίζουν την αθηρωματική πλάκα ως περιφερικό ιστό, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η δημιουργία των αφρωδών κυττάρων οφείλεται είτε στην αυξημένη προσαγωγή LDL, είτε στη μειωμένη απαγωγή HDL. Η αδυναμία σύνθεσης HDL (νόσος Tangier) είναι μία πολύ σπάνια αυτοσωματική υπολειπόμενη οικογενής διαταραχή με μηδαμινή συμμετοχή στην συνολική πληθυσμιακή επίπτωση της αθηρογένεσης. Η αθηρογένεση οφείλεται πρακτικά σε αυξημένη παρουσία κυκλοφορούσης LDL. Η έκθεση των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, των μονοκυττάρων, των ιστικών μακροφάγων, των λείων μυϊκών κυττάρων και των αιμοπεταλίων σε αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούσης LDL μπορεί να οφείλεται: (1) σε αυξημένη διατροφική πρόσληψη λιπιδίων,

(2) σε μεταλλάξεις ομόζυγες ή ετερόζυγες στο γονίδιο το υπεύθυνο για τη σύνθεση των μεμβρανικών LDL-υποδοχέων, (3) σε μεταλλάξεις ομόζυγες ή ετερόζυγες στο γονίδιο το υπεύθυνο για τη σύνθεση της απολιποπρωτεΐνης B-100, η οποία είναι απαραίτητο συστατικό των κυκλοφορούντων LDL για την αναγνώριση και πρόσληψη των κυκλοφορούντων LDL από τον LDL-υποδοχέα, ή τέλος (4) σε οποιοδήποτε συνδυασμό των παραπάνω (1), (2) και (3). Ανεξαρτήτως αιτίας, το σημείο κλειδί στην όλη υπόθεση είναι να εκτεθεί το κύτταρο, που θα μεταμορφωθεί σε αφρώδες και θα δημιουργήσει την αθηρωματική πλάκα, σε εξωκυττάρια επίπεδα LDL υψηλότερα από αυτά τα οποία μπορεί να προσλάβει μέσω των LDL-υποδοχέων. Η διαφορά συνολικής εξωκυττάριας LDL μείον εξωκυττάριας LDL προσληφθείσας από τους LDL-υποδοχείς μας δίνει την περίσσεια εξωκυττάριας επιπέδων LDL. Αυτά τα εξωκυττάρια κυκλοφορούντα επίπεδα LDL, που βρίσκονται μόνιμως σε περίσσεια, έχουν τις ακόλουθες δράσεις: (1) αυξημένη διαπερατότητα και διαπίδυση με μη-ειδικό τρόπο εντός του αρτηριακού τοιχώματος, (2) ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, (ως πρωταρχική βλάβη πιθανά μέσω NF-κΒ μεταγραφικών παραγόντων), με αποτέλεσμα επιπτώσεις στην κυτταρική απόπτωση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας καθώς και αυξημένη προσκόλληση μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων, και (3) αυξημένη αθηρογενετική ικανότητα.

Η αυξημένη αθηρογενετική ικανότητα της πλεονάζουσας εξωκυττάριας LDL οφείλεται σε τοπική χημική τροποποίηση που υφίσταται το μόριο της LDL. Η πλεονάζουσα εξωκυττάρια LDL παγιδεύεται στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου υφίσταται οξειδωση. Κυρίως οι αποπρωτεΐνες B-100, αλλά και τα LDL-λιπίδια οξειδώνονται και αποδομούνται από ελεύθερες τοξικές ρίζες όπως $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , CO^{\cdot} , καθώς και $RCOO^{\cdot}$. Αυτές οι ελεύθερες τοξικές ρίζες απελευθερώνονται έτοιμες και προσχηματισμένες από τα κυτταροπλασματικά κοκκία ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και υποενδοθηλιακών αιμοπεταλίων, μονοκυττάρων και ιστικών μακροφάγων. Η σύνθεση τους βασίζεται στην ενεργοποίηση

του NADPH οξειδωτικού συστήματος και στην παραγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου $O_2^{\cdot-}$. Το σουπεροξείδιο με την σειρά του μετατρέπεται σε HO^{\cdot} , H_2O_2 καθώς και σε τοξικά παράγωγα NO όταν αντιδρά με το NO . Η οξείδωση και η αποικοδόμηση των αποπρωτεΐνων B-100 οδηγεί στη δημιουργία οξειδωτικά τροποποιημένων - LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο. Οι οξειδωτικά τροποποιημένες-LDL φέρουν υψηλότερο ηλεκτραρνητικό φορτίο, έχουν μικρότερη τιμή υδατικής πυκνότητας, χαμηλότερο λόγο πρωτεΐνης/λιπίδια και πολύ υψηλό ποσοστό αποικοδόμησης της αποπρωτεΐνης B-100, συγκριτικά με τις φυσιολογικές μη-οξειδωτικά τροποποιημένες LDL. Αυτές οι οξειδωτικά τροποποιημένες-LDL έχουν ισχυρή αθηρογενετική δράση μέσω των παρακάτω μηχανισμών: (1) είναι ισχυρά χημειοτακτικές για τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα, (2) αυξάνουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων, (3) αναστέλλουν την κινητικότητα και συνεπώς την απομάκρυνση των, ήδη εγκατεστημένων τοπικά στην αθηρωματική πλάκα, ιστικών μακροφάγων, (4) διεγείρουν τοπικά την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, (5) είναι ανοσογόνες, (6) είναι κυτταροτοξικές για τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και για τα λεία μυϊκά κύτταρα και (7) αναστέλλουν την έξοδο των φυσιολογικών, μη-οξειδωτικά τροποποιημένων LDL από τον υποενδοθηλιακό χώρο προς την κυκλοφορία, με αποτέλεσμα να παγιδεύουν και τις φυσιολογικές LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο, οδηγώντας τες μοιραία σε οξειδωτική τροποποίηση και αποικοδόμηση.

Η πιο σημαντική όμως αθηρογενετική ιδιότητα των τροποποιημένων LDL είναι η αθρόα ενδοκυττάρια πρόσληψή τους μέσω των scavenger LDL-υποδοχέων οι οποίοι υπάρχουν στην επιφάνεια των ιστικών μακροφάγων. Αν και τα μονοκύτταρα / ιστικά μακροφάγα εκφράζουν φυσιολογικούς LDL-υποδοχείς στην κυτταρική τους επιφάνεια, ο ρυθμός πρόσληψης της φυσιολογικής LDL μέσω των φυσιολογικών LDL-υποδοχέων είναι πολύ χαμηλός και δεν δικαιολογεί την μεταμόρφωση των ιστικών μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα. Μπορούν όμως τα ιστικά μακροφάγα να προσλάβουν, μέσω των scavenger LDL-υποδοχέων που εκφράζουν, οξειδωτικά τροποποιημένη-LDL σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες, και με τον τρόπο αυτό να μεταμορφωθούν σε αφρώδη

κύτταρα. Το τελικό αθροιστικό αποτέλεσμα όλων των προαναφερόμενων δράσεων είναι η αυξημένη αθηρογένεση σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς².

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί επίσης μείζονα παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη αθηρογένεσης. Η αιτιολογία της καλπάζουσας αθηρογένεσης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη είναι πολυπαραγοντική. Δύο είναι οι βασικοί βιοχημικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η χρόνια υπεργλυκαιμία μπορεί να οδηγήσει σε ενδοθηλιακή βλάβη και σε αθηρογένεση. Ο πρώτος βιοχημικός μηχανισμός σχετίζεται με την αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα του τοιχώματος των αρτηριών. Στα κύτταρα του τοιχώματος των αρτηριών, η μεταφορά γλυκόζης από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο δεν απαιτεί την παρουσία ινσουλίνης, αλλά γίνεται με παθητική συμμεταφορά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η χρόνια υπεργλυκαιμία να οδηγεί σε χρόνια αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης γλυκόζης στα κύτταρα αυτά. Η ενδοκυττάρια περίσσεια γλυκόζης μετατρέπεται σε μία πολυόλη όπως είναι η σορβιτόλη, μέσω του ενζύμου αναγωγής των αλδοζών.

Στη συνέχεια η σορβιτόλη μέσω της αφυδρογονάσης της σορβιτόλης μετατρέπεται σε φρουκτόζη. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση σορβιτόλης και φρουκτόζης να προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας οσμωτικότητας με επακόλουθη είσοδο ύδατος από τον εξωκυττάριο προς τον ενδοκυττάριο χώρο και οσμωτική κυτταρική βλάβη στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτή η οσμωτική κυτταρική βλάβη θα μπορούσε να αποτελέσει μια μορφή πρωταρχικής ενδοθηλιακής βλάβης, η οποία θα πυροδοτήσει τη χρόνια φλεγμονώδη απάντηση που θα οδηγήσει σε αθηρογένεση. Ο δεύτερος βιοχημικός μηχανισμός μέσω του οποίου η χρόνια υπεργλυκαιμία προκαλεί αθηρογένεση είναι η μη-ενζυμική γλυκοζυλίωση. Πρόκειται για τη διαδικασία κατά την οποία η γλυκόζη συνδέεται χημικά με αμινομάδες πρωτεϊνών χωρίς τη μεσολάβηση ενζύμων. Σε ένα πρώτο άμεσο στάδιο διάρκειας ολίγων ωρών, η γλυκόζη αντιδρά μη-ενζυμικά με την πρωτεϊνική αμινομάδα και σχηματίζει ένα αρχικό-πρώιμο, ασταθές και αναστρέψιμο προϊόν

γλυκοζυλίωσης που καλείται βάση Schiff. Σε ένα δεύτερο στάδιο διάρκειας ολίγων ημερών η βάση Schiff υφίσταται μία εσωτερική αναδιάταξη τύπου Amadori και δημιουργείται έτσι ένα τελικό-πρώιμο, επίσης αναστρέψιμο, αλλά περισσότερο σταθερό, προϊόν γλυκοζυλίωσης που είναι μία κετοαμίνη τύπου Amadori. Οι δημιουργηθείσες, επί των πρωτεϊνών, κετοαμίνες τύπου Amadori, αντί να διασπασθούν, υφίστανται, μέσα σε διάστημα αρκετών εβδομάδων, μία βραδεία σειρά χημικών αναδιατάξεων που οδηγούν στο σχηματισμό σταθερών και μη-αναστρέψιμων τελικών προϊόντων όψιμης γλυκοζυλίωσης γνωστών ως AGEs (Advanced Glycosylation End products).

Τα AGEs μπορούν να σχηματιστούν τόσο επί των πρωτεϊνών όσο και επί των λιπιδίων και να προκαλέσουν διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ των μακρομορίων (AGE-induced cross-linking). Οι AGE cross-linked πρωτεΐνες γίνονται ανθεκτικές στη διάσπαση από πρωτεολυτικά ένζυμα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος ζωής τους και να ευνοείται η εναπόθεσή τους στους ιστούς. Η χημική τροποποίηση τύπου AGEs που υφίστανται οι LDL-λιποπρωτεΐνες στην παρατεταμένη υπεργλυκαιμία ονομάζεται παραγωγή (derivatization). Η παραγωγή μπορεί να πάρει τη χημική μορφή γλυκοζυλίωσης, ακετυλίωσης ή σύνδεσης με μαλόνυλο-αλδεΐδη. Οι AGEs-τροποποιημένες, LDL-λιποπρωτεΐνες παγιδεύονται στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο και στο εν τω βάθει αρτηριακό τοίχωμα. Αυτό συμβαίνει γιατί η AGEs τροποποίηση των LDL-λιποπρωτεϊνών, καθυστερεί την έξοδο των LDL-λιποπρωτεϊνών από το εν τω βάθει αρτηριακό τοίχωμα και από τον υπο-ενδοθηλιακό χώρο προς την κυκλοφορία.

Η έξοδος καθυστερεί γιατί τα AGEs δημιουργούν cross-linking ανάμεσα στην απολιποπρωτεΐνη B-100 και στο υπο-ενδοθηλιακό κολλαγόνο τύπου IV της βασικής μεμβράνης του ενδοθηλίου. Το cross-linking ανάμεσα στο κολλαγόνο και τις LDL είναι τόσο ισχυρότερο, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός της μη-ενζυμικής γλυκοζυλίωσης του κολλαγόνου. Το τελικό αποτέλεσμα είναι να αυξηθεί η εναπόθεση χοληστερόλης στον έσω αρτηριακό χιτώνα και να επιταχυνθεί η διαδικασία της αθηρογένεσης. Η μη-ενζυμική γλυκοζυλίωση των LDL-λιποπρωτεϊνών τις τροποποιεί έτσι ώστε να αναγνωρίζονται και

να προσλαμβάνονται εύκολα από τους scavenger LDL-υποδοχείς. Η μη-ενζυμική γλυκοζυλίωση των HDL τις τροποποιεί έτσι ώστε να γίνουν πιο εύκολα αποδομήσιμες από τις φυσιολογικές HDL. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων κυκλοφορούντων HDL στον σακχαρώδη διαβήτη. Η μείωση των HDL προκαλεί μειωμένη απομάκρυνση χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς επιδεινώνοντας έτσι την αθηρογένεση. Τα AGEs προσδένονται επιπλέον σε υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας ενδοθηλιακών κυττάρων, μονοκυττάρων, ιστικών μακροφάγων, αιμοπεταλίων και λείων μυϊκών κυττάρων και τους τροποποιούν. Η τροποποίηση των υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας, των κυττάρων αυτών, από τις AGEs, επιφέρει μια πληθώρα βιολογικών επιδράσεων όπως: (1) αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας, (2) αυξημένη πηκτική δραστηριότητα (procoagulant activity) επί των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων, (3) αυξημένη συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων, (4) αυξημένη χημειοταξία και μετανάστευση των μονοκυττάρων, (5) αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας (λαμίνης, κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών) από τους ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα, καθώς και (6) αυξημένη απελευθέρωση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων από τα ιστικά μακροφάγα. Τέλος τα AGEs επιφέρουν και χημικές επιδράσεις όπως: (1) επάγουν την οξείδωση των λιπιδίων, και (2) προκαλούν απενεργοποίηση του NO. Το σύνολο των προαναφερόμενων βιολογικών και χημικών επιδράσεων των AGEs υποβοηθεί την πρόοδο της αθηρογενετικής διαδικασίας σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη³.

Όπως προκύπτει, η αθηρογενετική διαδικασία, ασχέτως αν προκαλείται από την υπερλιπιδαιμία ή τον σακχαρώδη διαβήτη, συνιστά σε πρωταρχικό παθολογοανατομικό επίπεδο μία χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία, όπου πρωταρχικό ρόλο παίζει η ενεργοποίηση και δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και η τοπική εναπόθεση λευκοκυττάρων (μονοκυττάρων / ιστικών μακροφάγων). Η απελευθέρωση ελεύθερων τοξικών ριζών όπως O_2^- , $HO\cdot$, $NO\cdot$, $CO\cdot$, καθώς και $RCOO\cdot$ προκαλεί οξειδωτική τροποποίηση των LDL-λιποπρωτεϊνών. Το O_2^- συνεισφέρει επιπλέον στην διέγερση της

ανάπτυξης των λείων μυϊκών κυττάρων και στη βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το O_2^- είναι το πλέον δραστικό μόριο το οποίο πυροδοτεί και προωθεί την αθηρογενετική διαδικασία. Η σύνθεση του O_2^- γίνεται είτε άμεσα κατά την μιτοχονδριακή αυτό-οξειδωση, είτε ενζυμικά με τη μεσολάβηση κυτταροπλασματικών ενζύμων όπως οξειδάση του κυτοχρώματος P-450, ξανθινο-οξειδάση, καθώς και άλλες οξειδάσες που χρησιμοποιούν το NADPH ως συνένζυμο. Η απενεργοποίηση των ελεύθερων τοξικών ριζών γίνεται από είτε από αντιοξειδωτικά (τοκοφερόλη-διάσπαση αλυσιδωτών αντιδράσεων, αλβουμίνη, σερουλοπλασμίνη και τρανσφερίνη-χήλωση μεττάλων καταλυτών, παράγοντες που περιέχουν σουλφυδρυλικές ομάδες όπως κυστεΐνη και γλουταθειόνη) είτε από ενζυμικά συστήματα (δισμουτάση του σουπεροξειδίου, καταλάση του H_2O_2 και περοξειδάση της γλουταθειόνης)^{4,5}.

Συνεπώς αναστολές των ενζύμων των υπεύθυνων για την παραγωγή ελεύθερων τοξικών ριζών, ή επαγωγείς των ενζύμων των υπεύθυνων για την απενεργοποίηση ελεύθερων τοξικών ριζών, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία μελλοντική θεραπευτική γραμμή για την πρόληψη, ή την αναστολή της αθηρογενετικής διαδικασίας.

Τα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα που αποτρέπουν την παραγωγή ελεύθερων τοξικών ριζών, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος απέναντι στους αθηρογενετικούς επαγωγείς. Υπάρχει και μία δεύτερη γραμμή άμυνας η οποία συνιστάται στην αντίσταση των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος απέναντι στην επίδραση των ήδη προσχηματισθέντων αθηρογενετικών τελεστών κύριος εκπρόσωπος των οποίων είναι, όπως περιγράψαμε, το O_2^- . Η δεύτερη αυτή γραμμή άμυνας εμποδίζει την ανάπτυξη της αθηρογένεσης αναστέλλοντας: (1) τη συγκόλληση των μονοκυττάρων και των ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο, (2) τη συγκόλληση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, (3) τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και (4) την οξειδωτική τροποποίηση των LDL. Η δεύτερη αυτή γραμμή άμυνας διαμεσολαβείται από το οξειδίο του αζώτου (NO). Το NO συντίθεται ενζυμικά από τη συνθάση του NO. Η συνθάση του NO (NOS), χρησιμοποιεί L-αργινίνη και μοριακό O_2 ως

υποστρώματα και NADPH ως προσθετική ομάδα προκειμένου να συνθέσει NO. Υπάρχουν δύο τύποι NOS. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα η NOS υπάρχει σε σταθερές ενδοκυττάριας συγκεντρώσεις και ενεργοποιείται ταχύτατα από την ενδοκυττάρια αύξηση συγκεντρώσεως ιόντων ασβεστίου παρουσία καλμοδουλίνης. Η είσοδος ασβεστίου εντός των ενδοθηλιακών κυττάρων πυροδοτεί την ταχύτατη παραγωγή NO. Στα ιστικά μακροφάγα η NOS δεν υπάρχει σε σταθερές ενδοκυττάριας συγκεντρώσεις, αλλά η σύνθεσή της επάγεται από την επίδραση κυτταροκινών όπως η INF- γ . Η NOS των μακροφάγων δεν απαιτεί παρουσία υψηλών ενδοκυττάριας συγκεντρώσεων ασβεστίου για να ενεργοποιηθεί. Το NO το οποίο παράγεται είτε από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, είτε από τα μακροφάγα είναι αέριο με χρόνο ημίσειας ζωής ολίγων δευτερολέπτων το οποίο δρά τοπικά, αναστέλλοντας την αθηρογενετική διαδικασία μέσω των δράσεων που περιγράψαμε, και επάγοντας ελάττωση του μυϊκού τόνου των λείων μυϊκών ινών του αρτηριακού τοιχώματος με αποτέλεσμα

αγγειοδιαστολή. Η βλάβη στο μεταβολικό δρόμο της συνθάσης του NO είναι ίσως από τα πρώτα γεγονότα στην διαδικασία της αθηρογένεσης. Ελάττωση στη σύνθεση του NO μπορεί να συνεισφέρει στην έναρξη και πρόοδο της αθηρογένεσης. Συνεπώς επαγωγείς της NOS θα μπορούσαν με τη σειρά τους να αποτελέσουν μία μελλοντική θεραπευτική γραμμή για την πρόληψη ή αναστολή της αθηρογενετικής διαδικασίας. Το NO και το $O_2^{\cdot-}$ αντιδρούν μεταξύ τους απενεργοποιώντας το ένα το άλλο σύμφωνα με την αντίδραση: $NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow \rightarrow \rightarrow NO_3^-$. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ NO και $O_2^{\cdot-}$ είναι κρίσιμη για την έναρξη και την πρόοδο της πορείας της αθηρογένεσης^{4,5}.

Η διαταραχή της ισορροπίας αυτής είναι κοινή τόσο στην διαβητική όσο και στην υπερλιπιδαιμική αθηρογένεση. Δυνητικές μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές, όσον αφορά την πρόληψη της αθηρογένεσης, θα μπορούσαν να έχουν ως στόχο την μετατόπιση της ισορροπίας αυτής προς όφελος του οξειδίου του αζώτου.

REFERENCES

1. Robbins, Kumar, Cotran . The Pathologic Basis of Disease.
2. Marinetti GV. Disorders of Lipid Metabolism.
3. Ruderman N, Williamson J, Brownlee M. Hyperglykemia, Diabetes and Vascular Disease.
4. Maines MD. Nitric Oxide Synthase: Characterization and Functional Analysis.
5. Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation.

ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΠΡΩΪΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Έ. Γ. Λιβιεράτος

ΠΕΔΥ Μονάδα Υγείας Πάτρας

PREVENTION AND PRIMARY DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

H. G. Livieratos

PEDY Health Unit of Patras

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σήμερα την πιο κοινή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών, με καταγεγραμμένα περίπου 1.000.000 νέα κρούσματα παγκοσμίως.

Είναι γεγονός ότι ο δυτικός τρόπος ζωής ευνοεί τη μεγαλύτερη έκθεση των γυναικών σε τεκμηριωμένους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Με την προσθήκη της μαστογραφίας στις εξετάσεις ρουτίνας, πολλοί καρκίνοι εντοπίζονται έγκαιρα κι άρα μπορούν να αντιμετωπισθούν με πολύ καλύτερα αποτελέσματα.

Η έγκαιρη διάγνωση μέσω της αυτοεξέτασης και της μαστογραφίας δίνει στην ασθενή τη δυνατότητα να αντιμετωπίσει τον καρκίνο με ασύγκριτα καλύτερες πιθανότητες επιβίωσης.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος μαστού πρόληψη, αυτοεξέταση μαστών, ψηφιακή μαστογραφία, καρκίνος μαστού διάγνωση

ABSTRACT

Breast cancer is today the most common form of cancer among women, with about 1,000,000 new cases reported worldwide.

It is a fact that Western lifestyle favors the greater exposure of women to documented risk factors for breast cancer.

With the addition of mammography in the routine examinations, many cancers are detected early and can therefore be treated with much better results.

Timely diagnosis through self-examination and mammography gives the patient the ability to cope with cancer with an unparalleled chance of survival.

Keywords: breast cancer prevention, breast self-examination, digital mammography, breast cancer diagnosis

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σήμερα την πιο κοινή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών, με καταγεγραμμένα περίπου 1.000.000 νέα κρούσματα παγκοσμίως. Στις Η.Π.Α. τα κρούσματα ξεπερνούν τα 200.000 ετησίως, ενώ στην Ελλάδα διαγιγνώσκονται περίπου 4.500 γυναίκες με καρκίνο του μαστού κάθε χρόνο. Υπολογίζεται (βάσει στοιχείων του έτους 2008) ότι 1 στις 8 γυναίκες στην Αμερική και 1 στις 9 στην Ευρώπη θα νοσήσει από κακοήγη μαστική νεοπλασία κάποια στιγμή στη ζωής της. Μόλις το 30% από τις γυναίκες αυτές έχει ιστορικό κληρονομικότητας στην οικογένεια. Στην Ελλάδα το αναλογικό ποσοστό κρουσμάτων είναι 1 στα 12.

Ακούγεται κοινότυπο αλλά είναι πέρα για πέρα αληθινό. Η καλύτερη θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού είναι η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση και αυτό το μήνυμα πρέπει να περάσει στις Ελληνίδες. Να παραμερίσουν τους φόβους και τις προκαταλήψεις και να κάνουν συχνές εξετάσεις.

Η πρόληψη του καρκίνου του μαστού διακρίνεται σε πρωτογενή και δευτερογενή:

Πρωτογενής πρόληψη καλείται το σύνολο των ενεργειών που αποσκοπούν στην παρεμπόδιση ανάπτυξης καρκίνου, ενώ δευτερογενής πρόληψη είναι ουσιαστικά η προσπάθεια έγκαιρης διάγνωσης ενός καρκίνου σε αρχικό στάδιο, ώστε να επιτύχουμε πρακτικά ίαση από τη νόσο.

1. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ

Οι τρόποι πρωτογενούς πρόληψης είναι οι παρακάτω¹:

- Τροποποίηση επιβαρυντικών παραγόντων κινδύνου (άσκηση, αποφυγή παχυσαρκίας, αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ και καπνίσματος, αποφυγή ακτινοβολίας, αποφυγή μακροχρόνιας χρήσης οιστρογόνων)
- Φαρμακευτική προφύλαξη (χορήγηση ταμοξιφαίνης)
- Χειρουργική προφύλαξη (μαστεκτομή)

1.1. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Είναι γεγονός πως η πολύπλευρη σημασία της σωστής διατροφής στη πρόληψη του καρκίνου, δεν αποτελεί σήμερα συνείδηση του μέσου πολίτη

Και όλα αυτά τη στιγμή που το WCRF και το AICR ανακοινώνουν πως ποσοστό της τάξεως του 30%-40% όλων των καρκίνων που εκδηλώνονται, σχετίζεται με την διατροφή, την μειωμένη σωματική δραστηριότητα, την παχυσαρκία και με άλλους παράγοντες, που βρίσκονται σε απόλυτη συνάρτηση με τον τρόπο ζωής μας και συνεπώς θα μπορούσαν να αλλάξουν.

Ο καρκίνος του μαστού, εφόσον αποτελεί τον πρώτο πιο κοινό καρκίνο στις γυναίκες, έγινε θέμα πολλών ερευνών για τον προσδιορισμό των παραγόντων που σχετίζονται με την αιτιολογία του. Η διατροφή είναι ένας υπό μελέτη παράγοντας. Οι έρευνες που μελετούν τη σχέση του καρκίνου και της διατροφής είναι αρκετά δύσκολες στο σχεδιασμό τους. Από τις μεγαλύτερες δυσκολίες είναι η σύγχυση στο κατά πόσο το τρόφιμο αυτό καθ' αυτό ή κάποιο συγκεκριμένο συστατικό σχετίζεται με τον καρκίνο και το γεγονός ότι κάποιοι άλλοι, μη διατροφικοί παράγοντες, μπορεί να επηρεάζουν περισσότερο από την ίδια την διατροφή.

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η διατροφή παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην πρόληψη πολλών χρόνιων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένων πολλών τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, ψαριών, καθώς επίσης και η πρόσληψη μονο-ακόρεστων (ελαιόλαδο) και πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων, βιταμίνης D, ασβεστίου, συσχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Επιπρόσθετα, η αυξημένη κατανάλωση κρέατος, πουλερικών και η πρόσληψη κορεσμένου ζωικού λίπους έχουν πιθανή αιτιολογική σχέση με τον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι παθήσεις που οφείλονται σε μη υγιεινή διατροφή, όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο συσχετίζονται ισχυρά με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Ένα διαδεδομένο διατροφικό πρότυπο που φαίνεται πως συμβάλει στην πρόληψη του καρκίνου είναι η παραδοσιακή διατροφή της Ελλάδας (η κρητική διατροφή πριν από τη δεκαετία του '60), η οποία έχει αποτελέσει τη

βάση της εκδοχής της μεσογειακής διατροφής.

Σε γενικές γραμμές, τα βασικά χαρακτηριστικά της μεσογειακής διατροφής είναι η περιορισμένη κατανάλωση ζωικών προϊόντων και η αυξημένη κατανάλωση ψαριών, η αυξημένη κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών, δημητριακών ολικής άλεσης, ξηρών καρπών και σπόρων, η καθημερινή κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, η μέτρια κατανάλωση κρασιού και η χρήση του ελαιόλαδου ως κύρια πηγή λίπους².

1.2. ΒΑΡΟΣ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Η σημαντική πρόσληψη βάρους του σώματος σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο προσβολής από καρκίνο του μαστού. Ο κίνδυνος των γυναικών με υπερβολικό βάρος σώματος για καρκίνο του μαστού είναι μεγαλύτερος μετά την ηλικία των 50 ετών κατά την εμμηνοπαυσιακή φάση της ζωής τους. Οι γυναίκες που καταφέρνουν να αποβάλλουν τα περιττά κιλά και να διατηρούν ένα κανονικό βάρος σώματος πετυχαίνουν μείωση των πιθανοτήτων τους για καρκίνο του μαστού. Φαίνεται ότι τα περιστατικά καρκίνου σε γυναίκες με κληρονομούμενα τα μεταλλαγμένα γονίδια αυξάνονται ιδιαίτερα όταν είναι παχύσαρκες.

1.3. ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Σύμφωνα με στοιχεία πρόσφατων ερευνών η κατανάλωση ενός πακέτου τσιγάρων ημερησίως, από γυναίκες προ της εμμηνοπαύσης και για εννέα περίπου χρόνια, αυξάνει δραστικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού κατά σχεδόν 60%. Για γυναίκες μετά την εμμηνοπαύση το ποσοστό μειώνεται στο 50%, αλλά ούτως ή άλλως είναι αφυπνιστικά υψηλό. Η διακοπή του καπνίσματος έχει αποδειχτεί πως είναι σε θέση να μειώσει το σχετικό κίνδυνο³.

1.4. ΑΛΚΟΟΛ

Ο τρόπος με τον οποίο το αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός στους ερευνητές. Πιθανότατα σχετίζεται με τη λειτουργία των οιστρογόνων, αλλά η υπόθεση αυτή δεν έχει ακόμη στοιχειοθετηθεί. Πρόσφατες έρευνες έχουν επίσης αποκαλύψει τη σημασία της ηλικίας έναρξης κατανάλωσης αλκοόλ καθώς και της

συχνότητας κατανάλωσης. Άτομα που έπιναν σχεδόν καθημερινά από τα εφηβικά τους χρόνια αντιμετωπίζουν πολλαπλάσιο κίνδυνο σε σχέση με άτομα που δεν έπιναν καθόλου ή ελάχιστες φορές την εβδομάδα⁴.

1.5. ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΕ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Ιδιαίτερα στη δεύτερη δεκαετία της ζωής έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού μετά από 20 περίπου έτη.

1.6. ΛΗΨΗ ΑΝΤΙΣΥΛΛΗΠΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Τα περισσότερα αντισυλληπτικά χάπια περιέχουν οιστρογόνα, ο ρόλος των οποίων στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού έχει καταδειχτεί ποικιλοτρόπως. Παρ' όλα αυτά, οι μελέτες που αφορούν στη συσχέτιση καρκίνου του μαστού και αντισυλληπτικών χαπιών δεν έχουν συμπεράνει κάποια ισχυρή αλληλεπίδραση.

1.7. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

Η σωματική άσκηση συμβάλει στη πρόληψη κατά του καρκίνου του μαστού ακόμη και στις περιπτώσεις που δεν είναι έντονης ή μέτριας μορφής αλλά ελαφριάς. Η σωματική άσκηση μέτριας μορφής μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό μέτρο πρόληψης του καρκίνου του μαστού. Δραστηριότητες μέτριας έντασης μπορεί να είναι ποδηλασία, το περπάτημα, το απλό κολύμπι. Οι γυναίκες που κάνουν γρήγορο περπάτημα 2 έως 3 ώρες κάθε εβδομάδα επωφελούνται από μια μείωση του κινδύνου που διατρέχουν για καρκίνο του μαστού της τάξης του 20%.

1.8. ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΥΝ ΑΠΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Πολλές ερευνητικές εργασίες θεωρούν προστατευτικές ουσίες τις βιταμίνες C, D και E με την έννοια όμως ότι μειώνουν κάπως την πιθανότητα προσβολής από τη νόσο, χωρίς να εξασφαλίζουν την ανοσία.

ΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗ

Η ταμοξιφαίνη, είναι ένα φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως ως επικουρική θεραπεία για καρκίνο του μαστού μετά από χειρουργική εκτομή, και έχει βρεθεί ότι ελαττώνει τις μεταστάσεις και αυξάνει την επιβίωση σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά 30%. Έχει χρησιμοποιηθεί προληπτικά σε υγιείς γυναίκες υψηλού κινδύνου με

κληρονομικό καρκίνο έχοντας μειώσει την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού κατά 50%. Δεν χορηγείται προληπτικά στον πληθυσμό διότι προκαλεί εμμηνόπαυση, μπορεί να έχει παρενέργειες και να καταστεί επιζήμιο.

ΑΣΠΙΡΙΝΗ

Ο ρόλος της ασπιρίνης στην αντιμετώπιση του καρκίνου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Νέα στοιχεία συσχετίζουν την ασπιρίνη με θετικές δράσεις ενάντια στον καρκίνο του μαστού.

Μια νέα ενδιαφέρουσα έρευνα από τις Η.Π.Α. έδειξε ότι οι γυναίκες που έπασχαν από καρκίνο του μαστού και οι οποίες λάμβαναν ασπιρίνη μετά το τέλος των θεραπειών τους, είχαν λιγότερες πιθανότητες μεταστάσεων της νόσου και αύξηση του χρόνου επιβίωσης σε σύγκριση με γυναίκες της ίδιας πάθησης οι οποίες δεν λάμβαναν ασπιρίνη.

ΠΡΑΣΙΝΟ ΤΣΑΙ

Ουσίες που περιέχονται μέσα στο τσάι πιθανόν να προστατεύουν τις γυναίκες από καρκίνο του μαστού. Στις χώρες της Ασίας όπου υπάρχει καθημερινή κατανάλωση πράσινου τσαγιού έχει παρατηρηθεί ότι στις γυναίκες εμφανίζονταν λιγότεροι καρκίνοι του μαστού.

Το πράσινο τσάι περιέχει πολυφαινόλες οι οποίες είναι πολύ ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες. Σε έρευνα που έγινε σε πειραματόζωα χορήγησαν πράσινο τσάι μέσα στο νερό τους και παρατηρήθηκε ότι οι όγκοι μαστού ήταν μικρότεροι και λιγότερο επιθετικοί σε σχέση με τους όγκους των ζώων που δεν ελάμβαναν πράσινο τσάι.

ΘΗΛΑΣΜΟΣ

Ο θηλασμός μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού είναι σπανιότερος στις μητέρες που θηλάζουν για περισσότερο από 2 χρόνια τα παιδιά τους. Έχουν 50% λιγότερες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού.

1.9. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Ο όρος χειρουργική προφύλαξη αναφέρεται στην προφυλακτική μαστεκτομή με ή χωρίς πλαστική αποκατάσταση των μαστών. Επιλέγεται συνήθως σε ασθενείς πολύ

υψηλού κινδύνου όπως για παράδειγμα γυναίκες με ανίχνευση γονιδιακής μετάλλαξης BRCA1 και πολύ ισχυρό οικογενειακό ιστορικό. Εφόσον η μαστεκτομή εφαρμοστεί από ειδικά εκπαιδευμένους χειρουργούς, μειώνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού κατά 90% στις γυναίκες υψηλού κινδύνου. Είναι αρκετά επιθετική επιλογή με αρκετές ψυχολογικές επιπτώσεις για τη γυναίκα και γι' αυτό θα πρέπει να αποτελεί απόφαση της ίδιας, μετά από αρκετή προετοιμασία που περιλαμβάνει συστηματική ενημέρωση και ειδική ψυχολογική προετοιμασία⁵.

2. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ

Η δευτερογενής πρόληψη του καρκίνου του μαστού είναι η προσπάθεια έγκαιρης διάγνωσης ενός καρκίνου σε αρχικό στάδιο, ώστε να επιτύχουμε ουσιαστική ή πρακτική ίαση από τη νόσο. Μέθοδοι προσυμπτωματικού ελέγχου για τον καρκίνο του μαστού είναι η αυτοεξέταση, η ψηλάφηση από εξειδικευμένο και έμπειρο ιατρό και η μαστογραφία.

2.1. ΑΥΤΟΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΜΑΣΤΩΝ

Στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού η αυτοεξέταση έχει κεντρικό ρόλο. Στη χώρα μας έχει αναφερθεί ότι οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού ανακαλύπτονται από τις ίδιες τις γυναίκες. Υπολογίζεται ότι η τακτική αυτοεξέταση μπορεί να μειώσει σημαντικά τη θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού από 18-25% στα 5 χρόνια.

Η αυτοεξέταση των μαστών αποτελεί την πρώτη και βασική μέθοδο προληπτικής εξέτασης των μαστών και μπορεί να γίνει πολύ απλά στο σπίτι από την ίδια την γυναίκα. Μπορεί να διαρκέσει μερικά λεπτά την πρώτη φορά που θα το κάνει, αλλά όταν γνωρίσει καλύτερα τη μεθοδολογία, θα κερδίσει σε ταχύτητα κι εμπιστοσύνη. Είναι μια εύκολη, γρήγορη και δωρεάν διαδικασία, που έχει σώσει τις ζωές πολλών γυναικών. Πρέπει να γίνεται μια φορά κάθε μήνα, περίπου 7-10 μέρες μετά την έναρξη της εμμήνου ρύσεως, όταν οι μαστοί είναι συνήθως μαλακοί και λιγότερο ευαίσθητοι. Μετά την εμμηνόπαυση ή σε γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε αφαίρεση της μήτρας, η εξέταση μπορεί να γίνεται την ίδια μέρα κάθε μήνα⁶.

Η αυτοεξέταση πρέπει να ξεκινά με τη συμπλήρωση του 20^{ου} έτους της ηλικίας και να μην διακόπτεται ποτέ, ούτε κατά την εγκυμοσύνη ή την εμμηνόπαυση. Τονίζεται, ότι μόνο όταν εφαρμόζεται περιοδικά και συστηματικά, παρέχει στη γυναίκα τη δυνατότητα της εξοικείωσης της με τους μαστούς της, ώστε να γίνει εύκολα αντιληπτή οποιαδήποτε μεταβολή τους.

Η συστηματική μηνιαία αυτοεξέταση του μαστού δεν είναι αμελητέα, αλλά ανώδυνος, ανέξοδος κι ακίνδυνος τρόπος επανεκτίμησης της καλής υγείας του στήθους. Είναι υποχρέωση της κάθε γυναίκας να αφιερώνει λίγο χρόνο μια φορά το μήνα, όταν έτσι μπορεί να συμβάλει, με μια απλούστατη εξέταση ρουτίνας, στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού⁷.

2.2. ΜΑΣΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η μαστογραφία είναι η ακτινολογική μέθοδος μελέτης του μαστού. Είναι η περισσότερο καθιερωμένη μέθοδος εξέτασης του μαστού και οι διάφορες τεχνολογικές εφαρμογές όπως η θερμογραφία, η υπερηχογραφία, η αξονική τομογραφία και ο μαγνητικός συντονισμός δεν μπόρεσαν να την αντικαταστήσουν, είτε γιατί δεν έχουν την ανάλογη διαγνωστική εμβέλεια και ακρίβεια, είτε γιατί έχουν υψηλό κόστος και δεν είναι εύκολες στη χρήση τους. Η ειδική τεχνική της μαστογραφίας είναι η ακτινογράφιση των μαλακών ιστών του μαστού.

Είναι μία ακτινολογική εξέταση που μπορεί να εντοπίσει ακόμη και την ύπαρξη πολύ μικρού μεγέθους καρκίνου στο μαστό, όταν αυτός δεν έχει δώσει ακόμη, κανένα κλινικό εύρημα.

Σήμερα η συμβατική μαστογραφία βαθμιαία αντικαθίσταται, από την ψηφιακή μαστογραφία η οποία παρουσιάζει καλύτερη ευκρίνεια, άρα και καλύτερα διαγνωστικά αποτελέσματα και η γυναίκα δέχεται μικρότερη ποσότητα ακτινοβολίας.

Από πολλές τυχαίοποιημένες κλινικές δοκιμές με μεγάλο αριθμό γυναικών έχει δειχθεί ότι τα προγράμματα τακτικού, προληπτικού μαστογραφικού ελέγχου και κλινικής εξέτασης μειώνουν τους θανάτους από καρκίνο του μαστού κατά 20-30% στις γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών.

Από προηγούμενες μελέτες που δεν ήταν τυχαίοποιημένες είχε δειχθεί ότι, με τον προληπτικό μαστογραφικό έλεγχο, ο καρκίνος

του μαστού διαγιγνώσκεται σε πρωιμότερο στάδιο απ' ό,τι με κλινική εξέταση.

Η Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου (ACS) συνιστά να γίνεται η μαστογραφία κάθε χρόνο από την ηλικία των 40 ετών και μετά, ενώ το αμερικανικό Εθνικό Ίδρυμα Καρκίνου (National Cancer Institute) συνιστά να γίνεται η πρώτη μαστογραφία στα 40 και μετά κάθε 1 έως 2 χρόνια. Οι αντίστοιχοι ευρωπαϊκοί οργανισμοί, πάντως, συνιστούν πλέον να γίνεται η πρώτη μαστογραφία στην ηλικία των 36 ετών και να χρησιμοποιείται ως μέσον σύγκρισης με τις επόμενες μαστογραφίες. Η μαστογραφία έχει συμβάλει στην έγκαιρη διάγνωση πολλών περιπτώσεων καρκίνου με επακόλουθο καλές θεραπευτικές προοπτικές⁸.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Η Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου συνιστά ετησίως κλινική εξέταση μαστών, που να αρχίζει από την ηλικία των 40 ετών και μαστογραφικό έλεγχο ανά ένα με δυο έτη, μεταξύ των ηλικιών 40-50, και ακολούθως ανά έτος από την ηλικία των 50 και άνω. Ιδιαίτερη μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται για τις γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του μαστού, κάνοντας έναρξη μαστογραφικού ελέγχου σε μικρότερη ηλικία. Τέτοιες κατηγορίες γυναικών είναι αυτές με ισχυρό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, βιοψία του μαστού που ανέδειξε υπερπλασία των πόρων με ατυπία, καθώς και ασθενείς με ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΜΑΣΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η φυσική εξέταση του μαστού σε συνδυασμό με τη μαστογραφία αποδίδουν το μέγιστο στην έγκαιρη διάγνωση. Έτσι ένα ποσοστό 30-35% των καρκίνων ανακαλύπτεται με μόνη τη μαστογραφία, ενώ άλλο ένα 40% με μόνη την ψηλάφιση. Από μελέτες που έχουν γίνει, οι ειδικοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όλες οι γυναίκες ηλικίας 20-40 θα πρέπει να πραγματοποιούν έλεγχο στο στήθος τους με αυτοεξέταση ως εξέταση ρουτίνας και υπερηχογραφική μελέτη κατά την κρίση του ιατρού. Ενώ εκείνες μετά τα 40 θα πρέπει να ελέγχουν τους μαστούς τους με μαστογραφία. Διάφορες μελέτες έχουν γίνει κατά καιρούς για να αποδείξουν την αξιοπιστία και την αναγκαιότητα του screening (ελέγχου) με μαστογραφία, προσπαθώντας να

προσδιορίσουν ένα πρωτόκολλο που θα πρέπει να ακολουθηθεί ανάλογα με την ηλικία και τους παράγοντες κινδύνου.

Οι ενδείξεις μαστογραφίας είναι:

1. Επανελημμένος περιοδικός προληπτικός έλεγχος (screening)

- Έλεγχος γυναικών ηλικίας 40 ετών και άνω
- Επανάληψη κάθε 2 χρόνια σε γυναίκες ηλικίας 40-50 έτη
- Επανάληψη ανά έτος σε γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών

2. Μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα χωρίς γνωστή πρωτοπαθή εστία

3. Αλλοίωση της θηλής χωρίς ψηλαφητή μάζα

4. Όταν υπάρχουν υποκειμενικά ενοχλήματα (πόνος, έκκριση κλπ) αλλά απουσιάζουν τα κλινικά ευρήματα

5. Όταν έχουν ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού.

6. Όταν έχουν αδερφές ή μητέρες με καρκίνο (οικογενειακό ιστορικό) και μάλιστα, όταν είναι αμφοτερόπλευρος και προ της εμμηνόπαυσης. Οι γυναίκες της ομάδας αυτής ανήκουν στην κατηγορία του υψηλού κινδύνου γυναικών (High risk). Για τις γυναίκες κάτω των 40 ετών, που έχουν μητέρα ή αδερφή με καρκίνο του μαστού ωοθηκών σε ηλικία κάτω των 45 ετών, προτείνεται μια πρώτη μαστογραφία αναφοράς σε ηλικία 35 ετών⁹.

ΛΙΓΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΑΣΤΟΓΡΑΦΙΑ:

Η μαστογραφία είναι μια ανώδυνη εξέταση και διαρκεί λιγότερο από 5 λεπτά.

Ο κίνδυνος από την ακτινοβολία της μαστογραφίας ιδιαίτερα μετά την ηλικία των 40 ετών είναι πρακτικά ανύπαρκτος.

Το υπερηχογράφημα έχει ειδικές ενδείξεις στο μαστό και δεν αντικαθιστά την μαστογραφία.

Η κλινική εξέταση από εξειδικευμένο ιατρό είναι απαραίτητη και σε συνδυασμό με τη μαστογραφία ανεβάζει τη διαγνωστική ακρίβεια όσον αφορά τον καρκίνο, στο 98-99%.

Σε γυναίκες ηλικίας 25-30 ετών αποφεύγεται συνήθως η μαστογραφία για τους εξής λόγους:

1. Στην ηλικία αυτή, ο μαζικός αδέννας είναι πολύ πυκνός και κατά συνέπεια η εξέταση είναι χαμηλής διαγνωστικής αξίας.

2. Ο μαζικός αδέννας στη νεαρή ηλικία είναι περισσότερο ευαίσθητος στην ακτινοβολία και γι' αυτό αποφεύγουμε να τον ακτινοβολούμε αν δεν υπάρχει σοβαρός λόγος. Αν όμως υπάρξει εύρημα, τότε γίνεται μαστογραφία σε οποιαδήποτε ηλικία και αν είναι η γυναίκα.

Κάθε γυναίκα, προτού κλείσει το ραντεβού της για μαστογραφία, θα πρέπει να γνωρίζει, εφόσον βέβαια υπάρχει έμμηνος ρύση, ότι απαγορεύεται να υποβάλλεται στην εξέταση αυτή γύρω στη 2η φάση του εμμηνορρυσιακού της κύκλου, δηλαδή τις 10-15 ημέρες πριν από την επόμενη έμμηνο ρύση. Και ο λόγος είναι ότι επειδή ο μαστός αρχίζει να διογκώνεται μετά την ωορρηξία, μπορεί να έχουμε ψευδή ευρήματα. Συνιστάται, λοιπόν, η μαστογραφία να γίνεται μεταξύ της 4ης και της 10ης ημέρας του κύκλου, μετρώντας από την πρώτη ημέρα που εμφανίστηκε η έμμηνος ρύση και όχι από το τέλος της περιόδου.

Άλλες μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διάγνωση νοσημάτων του μαστού είναι το υπερηχογράφημα (U/S) και η μαγνητική τομογραφία (MRI) των μαστών.

3. ΠΡΩΪΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τη φράση του Haagensen "οποιοδήποτε σημείο νόσου στο μαστό μπορεί να οφείλεται σε καρκίνο", θα πρέπει να έχει πάντα κατά νου ο κλινικός γιατρός όταν εξετάζει ασθενή με συμπτωματολογία από το μαστό. Επειδή ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το μεγαλύτερο κίνδυνο για την υγεία της ασθενούς δεν θα πρέπει ποτέ να αγνοείται ή να υποτιμάται σαν ενδεχόμενο. Ο καρκίνος του μαστού θεραπεύεται πλήρως αν διαγνωστεί και αντιμετωπιστεί σε αρχικά στάδια¹⁰.

3.1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού μπορούν να παρουσιάσουν όγκο στον μαστό (έναν όζο, μια μάζα στο στήθος), έκκριση της θηλής αιματηρή ή μη, οίδημα, πόνος, εισολκή της θηλής, πρήξιμο ή μάζα σε μασχαλιαίο λεμφαδένα.

ΨΗΛΑΦΗΤΗ ΜΑΖΑ

Το πιο συνηθισμένο είναι η ψηλαφητή μάζα (77%). Συνήθως αυτή η μάζα είναι ανώδυνη

(66%), σκληρή, στερεά και ανώμαλη και δε διαχωρίζεται από τον υπόλοιπο μαστό¹¹.

ΕΚΚΡΙΣΗ ΘΗΛΗΣ

Σύμφωνα με τον Devitt των 2% των περιπτώσεων του καρκίνου εμφανίζει έκκριμα θηλής. Συνήθως η έκκριση από πολλαπλά τμήματα της θηλής σχετίζεται με ενδοκρινολογικά προβλήματα ή χρήση φαρμάκων. Σε καμία περίπτωση όμως δεν αποκλείει την περίπτωση καρκίνου. Ο χαρακτήρας του εκκρίματος δεν μπορεί να συσχετισθεί απόλυτα με καλοήγη ή κακοήγη νόσο γι' αυτό και θα πρέπει να εξετασθεί άμεσα.

ΠΟΝΟΣ

Δεν είναι συχνό σύμπτωμα, αν και περίπου το 20% των γυναικών μπορεί να αναφέρουν κάποιο ενόχλημα που να έχει σχέση με τον καρκίνο. Σπάνια αποτελεί την πρώτη κλινική εκδήλωση.

ΕΛΞΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Καθώς ο όγκος αυξάνει σε μέγεθος και διηθεί το γειτονικό αδενικό ιστό, η συνοδός ίνωση συρρικνώνει τους συνδέσμους του Cooper με αποτέλεσμα την χαρακτηριστική έλξη του δέρματος. Η έλξη του δέρματος θεωρήθηκε διαγνωστικό σημείο του καρκίνου του μαστού, σήμερα όμως γνωρίζουμε ότι μπορεί να προκληθεί και από καλοήθεις παθήσεις, όπως η νέκρωση λίπους, η πλασμα-τοκυτταρική μαστίτιδα και η νόσος του Mondor.

ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΗΛΗΣ

Εκτός από την έλξη του δέρματος ο καρκίνος του μαστού μπορεί να αλλοιώσει το φυσιολογικά σφαιρικό περίγραμμα του μαστού, ευθειάζοντας το κατά θέσεις, με αποτέλεσμα την απώλεια της συμμετρίας των δύο μαστών ή ακόμη και να προκαλέσει αλλοιώσεις στο χρώμα και/ή στο σχήμα της θηλής.

Άμεση διήθηση του δέρματος εμφανίζεται σαν μεμονωμένη πεπαχυσμένη πλάκα. Άλλες φορές διάταση των επιφανειακών φλεβών υποδηλώνει την ύπαρξη καρκίνου. Καθώς ο όγκος μεγαλώνει επέρχεται απόφραξη των λεμφαγγείων με επακόλουθο οίδημα δέρματος, ενώ οι σύνδεσμοι του Cooper που παραμένουν προκαλούν την όψη "φλοιού πορτοκαλιού". Σε προχωρημένα στάδια

παρατηρούνται δορυφόρα οζίδια στο δέρμα, εξέλκωση ή ρίκνωση ολόκληρου του μαστού¹².

ΜΑΣΧΑΛΙΑΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΟΠΑΘΕΙΑ

Η διόγκωση των λεμφαδένων της μασχάλης μπορεί να είναι το μόνο σημείο "αφανούς" καρκίνου του μαστού σύμφωνα με τον Halsted. Πιθανές πρωτοπαθείς εστίες μεταστατικού αδenoκαρκινώματος είναι το ήπαρ, ο πνεύμονας, οι ωθήκες, ο νεφρός, το στομάχι, το πάγκρεας και μαστός.

ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Τα χαρακτηριστικά του είναι: ερυθρότητα, θερμότητα, ευαισθησία δέρματος και οίδημα. Η κατάσταση αυτή μιμείται τόσο πολύ τις οξείες λοιμώξεις που δυστυχώς πολλές φορές αντιμετωπίζεται λανθασμένα με αντιβίωση. Τα σημεία αυτά μπορεί να εμφανίζονται εξ αρχής ή αργότερα κατά την διαδρομή της νόσου. Η διαδρομή της νόσου είναι ταχεία. Συνήθως παρατηρείται πρώτα όγκος στον μαστό ο οποίος ακολουθείται από ταχεία αύξηση του μεγέθους του μαστού μαζί με οίδημα και ερυθρότητα. Κατά την φυσική εξέταση το προεξάρχον σημείο είναι μια γενικευμένη σκληρία στο μαστό, η οποία μπορεί να συνοδεύεται από πόνο και αυξημένη θερμοκρασία¹³.

Σαν συμπλήρωμα της κλινικής εξέτασης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα διαγνωστικά μέσα και απεικονιστικές μέθοδοι.

Τέτοιες μέθοδοι είναι:

1. Ακτινολογική εξέταση. Αυτή περιλαμβάνει τη διεξαγωγή μιας μαστογραφίας και έναν υπερηχογραφικό έλεγχο των μαστών και των γειτονικών λεμφαδένων. Σε ορισμένους ασθενείς μπορεί να χρειαστεί μαγνητική τομογραφία των μαστών, ειδικά σε νεαρές γυναίκες με πυκνό μαστικό ιστό και γυναίκες με εμφυτεύματα σιλικόνης. Η MRI συνιστάται, επίσης, όταν καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται σε έναν ύποπτο μασχαλιαίο λεμφαδένα, αλλά στη μαστογραφία δεν εντοπίζεται όγκος ή όταν υπάρχει υποψία πολλών όγκων. Επιπρόσθετη διερεύνηση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί με ακτινογραφία θώρακος, υπερηχογράφημα κοιλίας και σπινθηρογράφημα οστών, ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο απομακρυσμένης διασποράς της νόσου, γνωστή και ως

μετάσταση.

2. **Βιοψία:** η λήψη δείγματος κυττάρων ή ιστού θα επισφραγίσει την όποια αρχική διάγνωση και θα συμβάλλει στον προσδιορισμό της φύσης και της επιθετικότητας του όγκου, σε περίπτωση που όντως υπάρχει κακοήθεια. Η αφαίρεση ιστού ή τμήματος του όγκου έχει στόχο μόνο διαγνωστικό και όχι θεραπευτικό. Η βιοψία μπορεί να διενεργηθεί με τους εξής τρόπους:

- I. **Βιοψία με λεπτή βελόνα (A):** περιλαμβάνει την εισαγωγή μίας πολύ μικρής κοίλης βελόνας η οποία λαμβάνει ένα μικρό δείγμα κυττάρων από την ύποπτη περιοχή. Το δείγμα στη συνέχεια περνά από κυτταρολογική εξέταση και αξιολογείται. Αυτού του είδους η βιοψία δεν αφήνει ουλές και ταλαιπωρεί ελάχιστα την εξεταζόμενη.
- II. **Βιοψία με βελόνα (B):** ο γιατρός κάνει μία μικρή τομή για να μπορέσει να εισαγάγει μία μεγαλύτερη βελόνα, ικανή να αφαιρέσει δείγμα ιστού από την ύποπτη περιοχή. Αυτού του είδους η βιοψία αφήνει μία μικρή ουλή που, όμως, γίνεται σχεδόν ανεπαίσθητη μετά από μερικές εβδομάδες.
- III. **Βιοψία διατομής ή διάνοιξης (incisional biopsy):** η βιοψία αυτή χρησιμοποιείται μόνον όταν οι δύο προηγούμενες αποτύχουν να δώσουν κατάλληλο δείγμα και μοιάζει περισσότερο με μια μικρή επέμβαση παρά με βιοψία. Περιλαμβάνει τη διενέργεια μιας μικρής τομής και αποσκοπεί στην αφαίρεση ενός μικρού τμήματος ιστού για εξέταση.
- IV. **Βιοψία εκτομής (excisional biopsy):** η βιοψία εκτομής είναι ακόμη πιο παρεμβατική και αποσκοπεί στην αφαίρεση ολόκληρου του ύποπτου όγκου από το στήθος¹⁴.

3.1.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο κλινικοεργαστηριακός έλεγχος του καρκίνου του μαστού, ολοκληρώνεται με την ανίχνευση των καρκινικών δεικτών (Tumor Markers). Πρόκειται για ουσίες, στην πλειονότητα τους αντιγόνα, που βρίσκονται

κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων. Ανιχνεύονται με ανοσοβιολογικές μεθόδους στον ορό των ασθενών. Δεν είναι όμως ειδικοί για τον καρκίνο γιατί απαντούν και σε καλοήθεις παθήσεις. Οι μέχρι τώρα πιο συχνά καρκινικοί δείκτες, που ανιχνεύονται στον καρκίνο του μαστού, είναι οι εξής:

T.P.A. (Tissue Peptid Antigen)

C.E.A. (καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο. Φ.Τ. μέχρι 5ng/ml)

CA-125, CA 19-9, A.F.P. (α-εμβρυϊκή σφαιρίνη)

Η ανεύρεση του αντιγόνου **CA 15 -3**, ειδικού του καρκίνου του μαστού (σε μικρή αναλογία απαντά σε καλοήθεις παθήσεις), βοήθησε πολύ στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου προ και μετά θεραπεία.

ΕΝ ΚΑΤΑΚΛΕΙΔΙ

Συνοψίζοντας, τα κρούσματα του καρκίνου του μαστού έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, αποτελώντας το σοβαρότερο κίνδυνο για τη ζωή του γυναικείου πληθυσμού. Είναι γεγονός ότι ο δυτικός τρόπος ζωής ευνοεί τη μεγαλύτερη έκθεση των γυναικών σε τεκμηριωμένους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Γι' αυτό το λόγο η **ΕΓΚΑΙΡΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ** θα πρέπει να είναι η πρώτη επιλογή όλων των γυναικών. Η θνησιμότητα από τον καρκίνο του μαστού έχει μειωθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία και εξακολουθεί να μειώνεται συστηματικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι με την προσθήκη της μαστογραφίας στις εξετάσεις ρουτίνας, πολλοί καρκίνοι εντοπίζονται έγκαιρα κι άρα μπορούν να αντιμετωπισθούν με πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Η έγκαιρη διάγνωση μέσω της αυτοεξέτασης και της μαστογραφίας δίνει στην ασθενή τη δυνατότητα να αντιμετωπίσει τον καρκίνο με ασύγκριτα καλύτερες πιθανότητες επιβίωσης¹⁵.

Η πρόληψη του καρκίνου του μαστού δεν είναι απλή υπόθεση ενός. Ο καρκίνος του μαστού, αρκετά μας έχει κλέψει, όχι υλικούς θησαυρούς, αλλά πολύτιμες υπάρξεις,

REFERENCES

1. Μαρκόπουλος Χ. (2004). Παθήσεις του μαστού. Αθήνα, Εκδόσεις Πασχαλίδης

2. Πινακίδης Μ., Μπόντης Λ. (1993). Καρκίνος Μαστού. Θεσσαλονίκη,

Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών University Studio Press

3. Rosato V., Bosetti C., Talamini R., Levi F., Negri E., La Vecchia C. (2011). [Metabolic syndrome and the risk of breast cancer]. *Recenti Prog Med*, vol.10
4. Καρβελάς Φ. (1995). Παράγοντες κινδύνου στον Καρκίνο του μαστού, τόμος 57, τεύχος 1, Περιοδικό «Ιατρική».
5. Ευρωπαϊκή Ογκολογική Εταιρία: www.esmo.org
6. CECIL Παθολογία. Copyright 1991. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
7. Harrison. Εσωτερική Παθολογία - 14^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνος
8. Barbara Bates. Οδηγός για κλινική εξέταση - Β'ΕΚΔΟΣΗ. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
9. Φύσσας Γ. (2006). Ο Μαστός και οι Παθήσεις του. Εκδόσεις Α.Α. Λιβάνη, Αθήνα.

10. Χαράτση-Γιωτάκη Ε. (2010). Σύγχρονη Εσωτερική Παθολογία, Αθήνα, Ιατρικές και Επιστημονικές Εκδόσεις
11. Στυλιανός Κ. Μπαρτσόκας. "Εισαγωγή εις την κλινικήν Διαγνωστικήν". Αθήνα 1968.
12. Κρεατσάς Γ. (2002). Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική II. Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης.
13. Bryan T, Snyder E. (2013). The Clinical Breast Exam: A Skill that Should Not Be Abandoned. *J Gen Intern Med*.
14. Γολεμάτης Β., Κακλαμάνος Ι., & Μπονάτσος Γ. (2006). Χειρουργική Παθολογία, Εκδόσεις Πασχαλίδης
15. Πάνω απ' όλα Γυναίκα, Οδηγός για τον Καρκίνο Μαστού. Πανελλήνιος Σύλλογος Γυναικών με Καρκίνο Μαστού "Άλμα Ζωής", Εκδόσεις Διόπτρα.

Η ΕΠΙΤΥΧΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΙΑΝΥΕΙ ΤΑ ΜΕΣΑ ΜΑΖΙΚΗΣ ΔΙΚΤΥΩΣΗΣ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΜΕΓΙΣΤΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

¹Π. Γκινόπουλος, ²Ι. Σταράκης, ³Φ. Καρβελάς, ³Π. Πατρικάκος, ⁴Ν. Χαροκόπος, ⁵Χ. Τσαγρή

¹ΜΧΜΘ- Ογκολογικό, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

²Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΓΝΠ Ρίο Πατρών

³Χειρουργική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

⁴Πνευμονολογικό Τμήμα Γενικό Νοσοκομείο Πύργου

⁵Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ)

SUCCESS OF CANCER PREVENTION AND CONTROL SHOULD BE PURSUED THROUGH SOCIAL MEDIA WHICH CAN MAXIMIZE THE RESULTS

¹P. Ginopoulos, ²I. Starakis, ³F. Karvelas, ³P. Patrikakos, ⁴N. Charokopos, ⁵Ch. Tsagri

¹Dept of Clinical Oncology, General Hospital of Patras «St Andreas»

²University Dept. of Internal Medicine UGHP Rio, Patras

³Surgery Clinic, General Hospital of Patras «St Andreas»

⁴Pulmonary Dept General Hospital of Pírgos

⁵Center for Disease Control & Prevention (HCDCP)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιτυχής πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου εξαρτάται από την αποτελεσματική και αξιόπιστη επικοινωνία μεταξύ των εργαζομένων στον τομέα της υγείας και των ασθενών.

Οι πρόοδοι στα κοινωνικά μέσα ενημέρωσης και στις πλατφόρμες mHealth παρείχαν νέους τρόπους για να ενισχύσουν την ανταλλαγή πληροφοριών σχετικά με τον καρκίνο. Άλλα πλεονεκτήματα της υιοθέτησης αυτής της τεχνολογίας είναι η αξιοποίηση των αναλυτικών δυνατοτήτων της, οι οποίες μπορούν να επεξεργαστούν την τεράστια ποσότητα πληροφοριών που παράγονται από τη διερεύνηση του γονιδιώματος με πολύ αποδοτικό τρόπο.

Σκοπός αυτής της ανασκόπησης είναι να δώσει μια γενική εικόνα των ταχέως εξελισσόμενων τομέων μέσω των οποίων η ψηφιακή δέσμευση αποδεικνύεται χρήσιμη στην πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος, πρόληψη, δικτύωση, μέσα, έλεγχος καρκίνου

ABSTRACT

The successful prevention and treatment of cancer is dependent upon efficient and reliable communication between healthcare workers and patients.

Advances in social media and mHealth platforms have provided new ways in which to enhance the sharing of cancer related information. Other benefits of embracing this technology include utilising its analytic capabilities which can process the vast quantity of information generated from genome exploration in a highly efficient manner.

The aim of this review is to provide an overview of the rapidly evolving areas through which digital engagement is proving useful in the prevention and control of cancer.

Keywords: cancer prevention, social media, cancer control, digital engagement

Tο Digital engagement αναφέρεται στην υιοθέτηση των κοινωνικών μέσων από τους επαγγελματίες του τομέα υγείας και τους ασθενείς τους¹. Οι εξελίξεις στην τεχνολογία των κοινωνικών μέσων ενημέρωσης έχουν ανοίξει το δρόμο για μια σειρά προόδων στον τομέα της πρόληψης και του ελέγχου του καρκίνου². Ο ίδιος ο καρκίνος αντιπροσωπεύει μια πολύπλοκη νόσο, όχι μόνο σε επίπεδο γονιδιώματος και πρωτεϊνώματος, αλλά και σε σχέση με τις βασικές αποφάσεις που πρέπει να ληφθούν σχετικά με τη θεραπεία που πρέπει να πραγματοποιηθεί^{3,4}. Η ψηφιακή ενσωμάτωση της θεραπείας και της πρόληψης του καρκίνου αποδεικνύεται μια αξιόπιστη και αποτελεσματική στρατηγική η οποία δυνητικά μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω βελτίωση της πολύπλοκης προσέγγισης της θεραπείας του καρκίνου^{5,6}. Η παγκόσμια επιβάρυνση από τον καρκίνο αναμένεται να επιδεινωθεί με την πάροδο του χρόνου με εκτιμώμενη αύξηση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου κατά 80% στα χαμηλά εισοδήματα και κατά 70% στις χώρες με χαμηλότερο μεσαίο εισόδημα έως το 2030⁷. Αυτό είναι παράλληλο με την αύξηση των ποσοστών χρήσης κινητών τηλεφώνων στις αναπτυσσόμενες χώρες⁸. Αυτή η αύξηση της χρήσης κινητών συσκευών μπορεί να αξιοποιηθεί για να βελτιωθεί η ευαισθητοποίηση, να διευκολυνθεί η πρόσβαση στον έγκαιρο έλεγχο και να διασφαλιστεί η κατάλληλη παρακολούθηση των ασθενών, ξεπερνώντας ορισμένα από τα συνήθη εμπόδια στον έλεγχο του καρκίνου⁹. Τα κοινωνικά μέσα παρέχουν μια χρήσιμη ευκαιρία για τη διάδοση πληροφοριών τόσο στους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης όσο και στους ασθενείς¹⁰. Τα δίκτυα microblogging όπως το Twitter® και τα κοινωνικά δίκτυα όπως το Facebook® επιτρέπουν στους ασθενείς να έχουν πρόσβαση σε πληροφορίες σχετικά με τη θεραπεία του καρκίνου και τα προληπτικά μέτρα για τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου^{11,12}. Η “δια κινητών” εξυπηρετούμενη υγεία (mHealth), η πρακτική της ιατρικής και της δημόσιας υγείας που υποστηρίζεται από κινητές συσκευές, είναι πλέον διαθέσιμη σε πολλές μορφές και

αποδεικνύεται πολύτιμη για την πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου¹³.

Έτσι, ο στόχος αυτής της ανασκόπησης είναι να παρέχει μια επισκόπηση των ταχέως εξελισσόμενων τομέων μέσω των οποίων το digital engagement αποδεικνύεται χρήσιμο στην πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου. Η παρούσα ανασκόπηση προσφέρει μια εικόνα για τις διαθέσιμες σήμερα ευκαιρίες κοινωνικής δικτύωσης για τους επαγγελματίες υγείας που σχετίζονται με τον καρκίνο, καθώς και πλατφόρμες για τη διάδοση πληροφοριών. Συζητάμε επίσης τις αναδυόμενες τεχνολογίες που έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου στο μέλλον.

Ογκολόγοι και λοιποί επαγγελματίες υγείας που απασχολούνται με το αντικείμενο των νεοπλασιών

Οι πλατφόρμες κοινωνικών μέσων παρέχουν μια εξαιρετική ευκαιρία για τους γιατρούς και άλλους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης να δικτυωθούν και να ανταλλάξουν ιδέες. Παρόλο που το Twitter® έχει περιορισμό στους χαρακτήρες που μπορείς να συντάξεις για την ανταλλαγή πληροφοριών, οι ιστοτόποι όπως το ResearchGate® λειτουργούν ως ψηφιακοί χώροι αποθήκευσης για δημοσιευμένες εργασίες, καθώς και φόρουμ στα οποία μπορούν να συζητηθούν από τα συμμετέχοντα μέλη¹⁴. Οι χρήστες μπορούν να ζητήσουν ανατυπώσεις δημοσιευμένων στο παρελθόν άρθρων σχετικά με τον καρκίνο. Οι χρήστες ενθαρρύνονται επίσης να αναπτύξουν προφίλ της επαγγελματικής τους εμπειρίας.

Ένα αρχικό παράδειγμα αυτής της ιδέας είναι το American Society for Clinical Oncology Community Forum¹⁵. Αυτό το φόρουμ παρέχει έναν χώρο προσανατολισμένο στην εξεύρεση λύσεων για τους ερευνητές με έδρα την κοινότητα, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τους επιστήμονες και βοηθούν να ξεπεραστούν ορισμένα από τα εμπόδια στη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών. Παρέχει μια πλατφόρμα δικτύωσης και ανταλλαγής προβλημάτων, έτσι ώστε να μπορούν να μοιραστούν εμπειρίες και να ξεπεραστούν τα προβλήματα με συνεργατικό τρόπο. Λειτουργεί επίσης ως αποθετήριο ιδεών και γνώσεων στο διαδίκτυο και παρέχει τη δυνατότητα κατάρτισης μέσω διαδικτύου.

Βιβλιογραφία με βάση τον καρκίνο και κοινωνικά μέσα

Η ιατρική βασισμένη στα αποδεικτικά στοιχεία αξιοποίησε με εποικοδομητικό τρόπο τις εξελίξεις στα κοινωνικά μέσα. Οι παραδοσιακές μέθοδοι πρόσβασης στις πληροφορίες περιλάμβαναν συνδρομές περιοδικών, περιοδικές συναντήσεις περιοδικών και πρόσβαση σε εγκαταστάσεις βιβλιοθήκης. Οι σύγχρονες ενημερώσεις της βιβλιογραφίας παρέχονται από πλατφόρμες κοινωνικών μέσων όπως το Twitter® σε μορφή πραγματικού χρόνου¹⁶. Αυτό παρέχει μια νέα δυναμική για τη διάδοση πληροφοριών στους ασθενείς και για τους ασθενείς να παρέχουν ανατροφοδότηση στους γιατρούς τους. Οι γιατροί είναι πλέον ενημερωμένοι για νέα δεδομένα αμέσως μόλις δημοσιευθούν στο διαδίκτυο.

Το microblogging επιτρέπει πρόσβαση σε σχετικά περιοδικά, επιστήμονες και γιατρούς που είναι πρωτοπόροι στον τομέα τους και επιτρέπει στους ακόλουθούς τους να επαναλάβουν άρθρα ή απόψεις που θεωρούν ότι είναι σημαντικές και πρέπει να τονιστούν. Τα αμφιλεγόμενα θέματα μπορούν επίσης να συζητηθούν σε αυτήν την πλατφόρμα¹⁷.

Υπάρχει ανάγκη να διασφαλιστεί η ακρίβεια και η εγκυρότητα των πληροφοριών αυτών, λόγω της ανοικτής και περιεκτικής φύσης των κοινωνικών μέσων ενημέρωσης και της ευκολίας μέσω της οποίας μπορούν να αναρτώνται ανακριβείς πληροφορίες. Για παράδειγμα, εξετάσαμε πρόσφατα την ακρίβεια του περιεχομένου σε απευθείας σύνδεση σχετικά με τον καρκίνο του μαστού¹⁸. Ακριβείς πληροφορίες ήταν δύσκολο να αποκτηθούν χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης Google® λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού μη ρυθμιζόμενων ιστότοπων.

Προηγμένη τεχνολογία στην πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου

Η ευρεία υιοθέτηση της προηγμένης τεχνολογίας από τους ασθενείς με καρκίνο και τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης έχει αλλάξει μεθόδους πρόληψης και ελέγχου του καρκίνου^{19,20}. Η προηγμένη τεχνολογία παρείχε μια αποτελεσματικότερη μέθοδο για τη διεξαγωγή ορισμένων πτυχών των προληπτικών δοκιμών και των κλινικών δοκιμών²¹. Έχει βελτιώσει την ένταση ασθενών και έχει καταφέρει να ξεπεράσει

τους περιορισμούς των υπάρχουσών μεθόδων μέσω των οποίων διεξάγονται οι δοκιμές^{22,23}. Ωστόσο, απαιτείται προσοχή όταν εισάγονται υπερσύγχρονες τεχνολογίες κατά τη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών για να διασφαλιστεί ότι οι βασικές πτυχές όπως η συγκατάθεση υλοποιούνται με τον κατάλληλο τρόπο²⁴.

Το Πρόγραμμα του Μεταστατικού Καρκίνου του Μαστού ανέφερε πρόσφατα ότι έχει προσλάβει με επιτυχία περισσότερους από 2.000 ασθενείς από κάθε κράτος στις ΗΠΑ για διάστημα επτά μηνών χρησιμοποιώντας κοινωνικά μέσα ενημέρωσης και έναν ειδικό ιστότοπο για την ένταξη ασθενών²⁵. Το έργο έχει εξαιρετικό ποσοστό ανταπόκρισης, ενώ το 95% των ασθενών έχουν υποβάλει τις απαιτούμενες λεπτομέρειες στην ομάδα μελέτης, η οποία εξετάζει παράγοντες που επηρεάζουν τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού σε γονιδιακό επίπεδο χρησιμοποιώντας ιστούς ασθενών.

Η προηγμένη τεχνολογία μπορεί επίσης να βελτιώσει την επιβίωση των καρκινοπαθών. Μια πρόσφατη τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη χρησιμοποίησε μια ειδική εφαρμογή για την ταυτοποίηση των πρώιμων συμπτωμάτων της υποτροπής του όγκου, των επιπλοκών και της έγκαιρης υποστηρικτικής φροντίδας για τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα υψηλού κινδύνου σε ασθενείς με νόσο σταδίου III/IV²⁶. Οι ασθενείς με πρόσβαση στην εφαρμογή βρέθηκαν να έχουν σημαντική βελτίωση στην επιβίωση χωρίς ασθένεια.

Οι ερευνητές του Κέντρου Καρκίνου Memorial Sloan Kettering ανέπτυξαν μια εφαρμογή γνωστικής πληροφορικής για την ενίσχυση της λήψης αποφάσεων για τον καρκίνο²⁷. Ο Watson για την ογκολογία παρέχει μια πλατφόρμα για τους γιατρούς να εισάγουν ορισμένα δεδομένα ασθενών. Στη συνέχεια, χρησιμοποιεί αυτές τις πληροφορίες για να επιλέξει κατάλληλες επιλογές θεραπείας για μεμονωμένους ασθενείς βάσει των παρεχόμενων πληροφοριών.

Μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ότι, αν και πρόκειται για χρήσιμη στήριξη για τη λήψη τεκμηριωμένων αποφάσεων, είναι χρονοβόρα²⁸. Εντούτοις, η ενσωμάτωση των ηλεκτρονικών ιατρικών αρχείων του ασθενούς με αυτό το σύστημα θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την επιβάρυνση του χρόνου.

Κύρια καρκινικά δεδομένα - Αποθήκευση και ανάλυση

Ο μεγάλος όγκος δεδομένων (big data) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ανάλυση, μέσω υπολογιστών, ευρέων δεδομένων που αφορούν στην υγεία ώστε να αναδείξει πρότυπα, τάσεις και συσχετίσεις²⁹.

Η αποθήκευση και ανάλυση μεγάλων βάσεων δεδομένων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έρευνα για τον καρκίνο και στην ανάπτυξη εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπείας και εξατομικευμένης ιατρικής περίθαλψης για ασθενείς με καρκίνο. Επιπλέον, η πληθώρα δεδομένων επιτρέπει την αναδρομική ανάλυση των δεδομένων ογκολογίας για τη μέτρηση παραμέτρων όπως η ποιότητα της περίθαλψης και μπορεί επίσης να διευκολύνει την παροχή ποιοτικής φροντίδας από επαγγελματίες του τομέα της υγείας σε πραγματικό χρόνο³⁰.

Οι διαθέσιμες στο κοινό βάσεις δεδομένων που περιέχουν δεδομένα γονιδιωματός από όγκους που έχουν προηγουμένως ταξινομηθεί σε εργαστήρια παγκοσμίως αποτελούν σημαντικό πόρο για τους ερευνητές. Μέσω αυτής της έρευνας βασισμένης στο γονιδίωμα είναι δυνατόν να δημιουργηθούν προφίλ συναίνεσης που αναγνωρίζουν γονίδια που συνήθως δεν ρυθμίζονται σε πολλαπλά ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων που παράγονται από διαφορετικά ερευνητικά ιδρύματα σε διεθνές επίπεδο. Ωστόσο, οι προσπάθειες εξέτασης του γονιδιωματός των επιμέρους όγκων αποφέρουν ένα μεγάλο όγκο δεδομένων. Η χρησιμότητα των πολλαπλών δεδομένων στον καθορισμό της πρόληψης και ελέγχου του καρκίνου έγκειται στην ικανότητα αποθήκευσης και ανάλυσης μεγάλων ποσοτήτων πληροφοριών με αποτελεσματικό και αξιόπιστο τρόπο. Στον καρκίνο του μαστού, για παράδειγμα, αυτή η προσέγγιση απέδωσε έναν προγνωστικό δείκτη με βάση το γονίδιο 21 για τον εντοπισμό των ασθενών που θα επωφεληθούν από επικουρική χημειοθεραπεία³¹. Αυτή η δοκιμασία, γνωστή ως Oncotype DX, έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των ασθενών που θα επωφεληθούν περισσότερο από την επικουρική χημειοθεραπεία³². Αυτή η προσέγγιση έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου³³.

Πολλαπλά δεδομένα αποδεικνύονται επίσης χρήσιμα στην πρόληψη του καρκίνου. Ο Ayers et al. χρησιμοποίησε πρόσφατα μεγάλες αναλύσεις δεδομένων για τη βελτιστοποίηση μιας εκστρατείας με στόχο την διακοπή του καπνίσματος³⁴.

Τηλεϊατρική

Η τηλεϊατρική είναι μια αναπτυσσόμενη περιοχή ψηφιοποίησης η οποία οδηγεί σε έναν πιο αποτελεσματικό τρόπο για την παροχή υγειονομικής περίθαλψης. Καταργεί γεωγραφικούς και κοινωνικοοικονομικούς περιορισμούς οι οποίοι προηγουμένως περιόριζαν την πρόσβαση για μεγάλο αριθμό ασθενών³⁵. Η τηλεδερματοσκοπία δημιουργήθηκε για να διευκολύνει την ανίχνευση των μελανωμάτων. Οι ασθενείς μπορούν να διαβιβάσουν μια εικόνα μιας ύποπτης βλάβης στο δερματολόγο τους και αυτή να αξιολογηθεί κατάλληλα.

Ο Horsham et al. πρόσφατα διερεύνησε την αποδοχή από τον ασθενή αυτής της μεθόδου και η έρευνά τους καταδεικνύει ότι αυτό είναι μια ευνοϊκή προσέγγιση, εν μέρει λόγω της ευκολίας αποφυγής επίσκεψης σε οποιοδήποτε κλινικό κέντρο³⁶. Αυτό υπογραμμίζει την ευκολία που μπορεί να συσχετιστεί με τη χρήση εικόνας υψηλής ευκρίνειας και ποιότητας ως μέρος του συστήματος παραπομπής.

mHealth και καρκίνος

Η ανταλλαγή μηνυμάτων κειμένου είναι μια χρήσιμη μέθοδος για να υπενθυμίσουμε στους ασθενείς τη σημασία της διατήρησης ενός υγιεινού τρόπου ζωής. Τα μηνύματα κειμένου μπορούν επίσης να αποτελέσουν χρήσιμη εκπαιδευτική μέθοδο. Ο Lee et al. πρόσφατα εξέτασε τα αποτελέσματα των μηνυμάτων εκπαιδευτικών κειμένων σχετικά με τον εμβολιασμό κατά του HPV και τα οφέλη του και σημείωσε σημαντική αύξηση στην πρόσληψη εμβολιασμού κατά του HPV μεταξύ των στοχοθετημένων πληθυσμών³⁷. Στα προγράμματα ανίχνευσης καρκίνου έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί και τα γραπτά μηνύματα σε μια προσπάθεια ενημέρωσης για το screening. Το screening του καρκίνου του παχέος εντέρου απευθύνεται γενικά σε πληθυσμούς άνω των 50 ετών. Ο Weaver et al. διερεύνησε πρόσφατα τον τρόπο με τον οποίο οι ηλικιωμένοι ασθενείς θα ήταν δεκτικοί σε γραπτά μηνύματα που

αποσκοπούσαν στην ενθάρρυνση της συμμετοχής τους σε screening προγράμματα. Οι ηλικιωμένοι πληθυσμοί βρέθηκαν πολύ δεκτικοί σε αυτό το είδος παρέμβασης³⁸.

Τεχνολογία προσαρμοζόμενης χρήσης

Η τεχνολογία προσαρμοζόμενης χρήσης είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας στην ψηφιοποιημένη εποχή, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ολοένα και περισσότερο με διαθέσιμες συσκευές και αισθητήρες από τους ασθενείς για την καταγραφή παραμέτρων, βασικών για την υγεία και το περιβάλλον ενός ασθενούς. Η τεχνολογία προσαρμοζόμενης χρήσης αναμένεται να ενισχύσει τα ποσοστά συμμετοχής σε κλινικές δοκιμές και τα ποσοστά συμμόρφωσης με τη θεραπεία. Οι συσκευές περιλαμβάνουν γυαλιά, ρολόγια και υφάσματα ικανά να παρακολουθούν τον καρδιακό ρυθμό και τη θερμοκρασία.

Ο Schwenk et al. πρόσφατα χρησιμοποίησε μια τεχνολογία φορητού υπολογιστή, με τη μορφή αισθητήρα ισορροπίας, που θα μπορούσε να βοηθήσει τους ασθενείς με περιφερική νευροπάθεια προκαλούμενη από χημειοθεραπεία. Στην τυχαίοποιημένη, ελεγχόμενη μελέτη τους, κατέδειξαν επιτυχή αξιοποίηση αυτής της τεχνολογίας σε ασθενείς³⁹.

Η χειρουργική ογκολογία επιδιώκει επίσης να υιοθετήσει τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας προσαρμοζόμενης χρήσης. Ο υπολογιστής Google glass (ένας H/Y που έχει δημιουργηθεί από την Google, σε σχήμα γυαλιών) σε συνδυασμό με ένα σύστημα απεικόνισης φθορισμού αναπτύσσονται για να διασφαλιστεί η πλήρης εκτομή των όγκων και τα ελεύθερα νόσου χειρουργικά όρια⁴⁰. Οι δοκιμές σε ένα μοντέλο ex vivo έδειξαν ότι η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση εναπομείνουσας νόσου και τη μείωση του κινδύνου υποτροπής του καρκίνου.

Μελλοντικές κατευθύνσεις

Σε εξέλιξη βρίσκονται αρκετές μελέτες ψηφιακής τεχνολογίας που σχετίζονται με τον έλεγχο και την πρόληψη του καρκίνου.

Οι μελέτες in silico διερευνούνται για την παροχή εικονικού περιβάλλοντος μέσω του οποίου μπορούν να δοκιμαστούν νέα

αντικαρκινικά φάρμακα⁴³. Σε τέτοιες δοκιμές, ένας εικονικός ασθενής θα έχει εικονική θεραπεία και τα αποτελέσματα της θεραπείας μπορούν να μετρηθούν⁴⁴. Παρόλο που η πρόθεση δεν είναι να αντικατασταθούν πλήρως οι πραγματικές κλινικές δοκιμές που αφορούν πραγματικούς ασθενείς, οι δοκιμές in silico έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν τον αριθμό των ασθενών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση κλινικής δοκιμής, καθώς και να περιορίσουν την έκθεση των ασθενών στις ανεπιθύμητες ενέργειες των υπό μελέτη φαρμάκων⁴⁵.

Οι χειρουργικές τεχνολογίες αρχίζουν επίσης να ενσωματώνουν ψηφιακές προόδους. Για παράδειγμα, το iKnife αντιπροσωπεύει ένα έξυπνο χειρουργικό νυστέρι που χρησιμοποιεί την τεχνολογία φασματομετρίας μάζας με γρήγορο εξατμιστικό ιονισμό⁴⁶. Πρόσφατα, αυτή η συσκευή αποδείχθηκε ότι είναι ικανή να διαφοροποιεί μεταξύ φυσιολογικών και κακοήθων ιστών σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η τεχνολογία βρίσκεται ακόμη στη φάση ανάπτυξης και απαιτούνται μελλοντικές μελέτες για την εξέταση της κλινικής χρησιμότητάς της.

Συμπεράσματα

Το digital engagement με τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης και τους ασθενείς με καρκίνο παρέχει πολύ αποτελεσματικές και αξιόπιστες μεθόδους μέσω των οποίων ο καρκίνος μπορεί να προληφθεί και να ελεγχθεί. Η πολυπλοκότητα που συνδέεται με τον καρκίνο ως διαδικασία ασθένειας το καθιστά ιδανικό στόχο για τον οποίο η ψηφιακή τεχνολογία μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο. Η ευκολία επικοινωνίας επιτρέπει την ταχεία διάδοση πληροφοριών μεταξύ των ειδικών του καρκίνου καθώς και των ασθενών τους.

Σε μοριακό όσο και κλινικό επίπεδο, τα πολλαπλά δεδομένα ανάλυσης εντοπίζουν νέα πρότυπα και προσεγγίσεις μέσω των οποίων η θεραπεία ασθενούς μπορεί να προσαρμοστεί και να βελτιστοποιηθεί ξεχωριστά. Είμαστε μόνο στην αρχή της ψηφιακής επανάστασης στην περίθαλψη του καρκίνου και υπάρχουν πολλά συναρπαστικά ψηφιακά έργα στον ορίζοντα που μπορεί να ενισχύσουν τον έλεγχο και την πρόληψη του καρκίνου στο μέλλον.

REFERENCES

1. Fisch MJ, Chung AE, Accordino MK. Using Technology to Improve Cancer Care: Social Media, Wearables, and Electronic Health Records. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:200-8.
2. Quinn EM, Corrigan MA, McHugh SM, et al. Who's talking about breast cancer? Analysis of daily breast cancer posts on the internet. *Breast* 2013;22:24-7.
3. Baldassarre G, Belletti B. Molecular biology of breast tumors and prognosis. *F1000Res* 2016;5.
4. Waitzkin H. Doctor-patient communication. Clinical implications of social scientific research. *JAMA* 1984;252:2441-6
5. Abramson K, Keefe B, Chou WY. Communicating about cancer through Facebook: a qualitative analysis of a breast cancer awareness page. *J Health Commun* 2015;20:237-43.
6. O'Brien C, Kelly J, Lehane EA, et al. Validation and Assessment of a Technology Familiarity Score in Patients Attending a Symptomatic Breast Clinic. *World J Surg* 2015;39:2441-9.
7. WHO, 2010 NCD Global action plan, *ibid*.
8. International Telecommunications Union, "The world in 2014: ICT facts and figures". Available online: <https://www.itu.int/en/ITU/Statistics/Documents/facts/ICTFactsFigures2014-e.pdf>
9. Eskandar H, Land MA, Pujari S, et al. Mobile technology in Cancer Control for emerging health systems: Digital divide or digital provide? Available online: <http://www.cancercontrol.info/wp-content/uploads/2015/07/65-70-Robinson.pdf>
10. Foley NM, Maher BM, Corrigan MA. Social media and tomorrow's medical students-how do they fit? *J Surg Educ* 2014;71:385-90
11. Xu S, Markson C, Costello KL, et al. Leveraging Social Media to Promote Public Health Knowledge: Example of Cancer Awareness via Twitter. *JMIR Public Health Surveill* 2016;2:e17.
12. Sawka AM, Straus S, Gafni A, et al. How can we meet the information needs of patients with early stage papillary thyroid cancer considering radioactive iodine remnant ablation? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;74:419-23.
13. Coughlin S, Thind H, Liu B, et al. Mobile Phone Apps for Preventing Cancer Through Educational and Behavioral Interventions: State of the Art and Remaining Challenges. *JMIR Mhealth Uhealth* 2016;4:e69.
14. Dey S. Preventing breast cancer in LMICs via screening and/or early detection: The real and the surreal. *World J Clin Oncol* 2014;5:509-19.
15. Robert N, Lilenbaum R, Hurley P. ASCO's Community Research Forum: addressing challenges of communitybased research from the grass roots. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014:e111-5.
16. O'Leary DP, Corrigan MA, McHugh SM, et al. From theater to the world wide web-- a new online era for surgical education. *J Surg Educ* 2012;69:483-6.
17. Radzikowski J, Stefanidis A, Jacobsen KH, et al. The Measles Vaccination Narrative in Twitter: A Quantitative Analysis. *JMIR Public Health Surveill* 2016;2:e1.
18. Quinn EM, Corrigan MA, McHugh SM, et al. Breast cancer information on the internet: analysis of accessibility and accuracy. *Breast* 2012;21:514-7.
19. Hao Y, Wolfram V, Cook J. A structured review of health utility measures and elicitation in advanced/metastatic breast cancer. *Clinicoecon Outcomes Res* 2016;8:293-303.
20. Liu L, Tian Z, Zhang Z, et al. Computer-aided Detection of Prostate Cancer with MRI: Technology and Applications. *Acad Radiol* 2016;23:1024-46.
21. Bricker JB, Mull KE, Kientz JA, et al. Randomized, controlled pilot trial of a smartphone app for smoking cessation using acceptance and commitment therapy. *Drug Alcohol Depend* 2014;143:87-94.
22. Heffner JL, Vilardaga R, Mercer LD, et al. Feature-level analysis of a novel smartphone application for smoking cessation. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2015;41:68-73.
23. Buller DB, Berwick M, Lantz K, et al. Smartphone mobile application delivering personalized, real-time sun protection advice: a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol* 2015;151:497-504.

24. Orri M, Lipset CH, Jacobs BP, et al. Web-based trial to evaluate the efficacy and safety of tolterodine ER 4 mg in participants with overactive bladder: REMOTE trial. *Contemp Clin Trials* 2014;38:190-7.
25. <https://www.mbcproject.org/>
26. Denis F, Lethrosne C, Pourel N, et al. Overall survival in patients with lung cancer using a web-application-guided follow-up compared to standard modalities: Results of phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2016;34:abstr LBA9006.
27. <https://www.mskcc.org/about/innovative-collaborations/watson-oncology>
28. Zauderer MG, Gucalp A, Epstein AS, et al. Piloting IBM Watson Oncology within Memorial Sloan Kettering's regional network. *J Clin Oncol* 2014;32:abstr e17653.
29. Gange SJ, Golub ET. From Smallpox to Big Data: The Next 100 Years of Epidemiologic Methods. *Am J Epidemiol* 2016;183:423-6.
30. Broughman JR, Chen RC. Using big data for quality assessment in oncology. *J Comp Eff Res* 2016;5:309-19.
31. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
32. McVeigh TP, Hughes LM, Miller N, et al. The impact of Oncotype DX testing on breast cancer management and chemotherapy prescribing patterns in a tertiary referral centre. *Eur J Cancer* 2014;50:2763-70.
33. Kopetz S, Tabernero J, Rosenberg R, et al. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors. *Oncologist* 2015;20:127-33.
34. Ayers JW, Westmaas JL, Leas EC, et al. Leveraging Big Data to Improve Health Awareness Campaigns: A Novel Evaluation of the Great American Smokeout. *JMIR Public Health Surveill* 2016;2:e16.
35. Quinn EM, Corrigan MA, O'Mullane J, et al. Clinical unity and community empowerment: the use of smartphone technology to empower community management of chronic venous ulcers through the support of a tertiary unit. *PLoS One* 2013;8:e78786.
36. Horsham C, Loescher LJ, Whiteman DC, et al. Consumer acceptance of patient-performed mobile teledermoscopy for the early detection of melanoma. *Br J Dermatol* 2016. [Epub ahead of print].
37. Lee HY, Koopmeiners JS, McHugh J, et al. mHealth Pilot Study: Text Messaging Intervention to Promote HPV Vaccination. *Am J Health Behav* 2016;40:67-76.
38. Weaver KE, Ellis SD, Denizard-Thompson N, et al. Crafting Appealing Text Messages to Encourage Colorectal Cancer Screening Test Completion: A Qualitative Study. *JMIR Mhealth Uhealth* 2015;3:e100.
39. Schwenk M, Grewal GS, Holloway D, et al. Interactive Sensor-Based Balance Training in Older Cancer Patients with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Randomized Controlled Trial. *Gerontology* 2016;62:553-63.
40. Shao P, Ding H, Wang J, et al. Designing a wearable navigation system for image-guided cancer resection surgery. *Ann Biomed Eng* 2014;42:2228-37.
41. Duregger K, Hayn D, Nitzlader M, et al. Electronic Patient Reported Outcomes in Paediatric Oncology - Applying Mobile and Near Field Communication Technology. *Stud Health Technol Inform* 2016;223:281-8.
42. Duregger K, Hayn D, Morak J, et al. An mHealth system for toxicity monitoring of paediatric oncological patients using Near Field Communication technology. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2015;2015:6848-51.
43. Hunter P, Chapman T, Coveney PV, et al. A vision and strategy for the virtual physiological human: 2012 update. *Interface Focus* 2013;3:20130004.
44. Clermont G, Bartels J, Kumar R, et al. In silico design of clinical trials: a method coming of age. *Crit Care Med* 2004;32:2061-70.
45. Kovatchev BP, Breton M, Man CD, et al. In silico preclinical trials: a proof of concept in closed-loop control of type 1 diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:44-55.
46. Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J, et al. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Sci Transl Med* 2013;5:194ra93.

H ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΤΟΥ ΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ EWING'S

THE MOLECULAR BASIS IN THE AETIOLOGY AND DIAGNOSIS OF EWING'S SARCOMA

¹Θ. Κουρέλης, ²Κ. Κουρέλης, ³Δ. Μπασιούκα, ⁴Μ. Κουτρούλη, ¹Π. Κουτσιαρά, ¹Ε. Γκαμούλου, ⁵Α. Ακτύπη, ⁶Στ. Γιώτης, ⁷Σ. Ξυνόγαλος, ⁸Ε. Λιβιεράτος, ⁹Χ. Τσαγρή και ¹⁰Π. Γκινόπουλος

¹Th. Kourelis, ²K. Kourelis, ³D. Basiouka, ⁴M. Koutrouli, ¹P. Koutsiara, ¹E. Gamoulou, ⁵A. Aktypi, ⁶St. Giotis, ⁷S. Xinogalos, ⁸H. Livieratos, ⁹Ch. Tsagri and ¹⁰P. Ginopoulos

¹Μονάδα Παθολογικής Ογκολογίας, «Ολύμπιον Θεραπευτήριο» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.

¹Medical Oncology Unit, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.

²ΩτοΡινοΛαρυγγολογική Κλινική, «Καραμανδάνειο» Νοσοκομείο Παίδων Πατρών

²ENT Clinic, «Karamandaneio» Children Hospital of Patras

³Νευρολογική Κλινική, Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών

³Neurology Clinic, Peripheral University Hospital of Patras

⁴Τομέας Γενετικής Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

⁴Section of Cell Genetic Biology and Development, Biology Dept., University of Patras "St Andreas"

⁵Αιματολογική Κλινική, «Ολύμπιον Θεραπευτήριο» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.

⁵Clinical Hematology Clinic, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.

⁶Φαρμακείο, «Ολύμπιον Θεραπευτήριο» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.

⁶Pharmacy, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.

⁷Ειδικό Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Πειραιά «Μεταξά», Τομέας Παθολογικής Ογκολογίας

⁷Special Anticancer Hospital of Peiraus "Metaxa", Dept. of Medical Oncology

⁸ΠΕΔΥ Μονάδα Υγείας Πάτρας

⁸PEDY Health Unit of Patras

⁹Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων

⁹Center for Disease Control & Prevention

¹⁰ΜΧΜΘ-Ογκολογικό, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

¹⁰Dept of Clinical Oncology, General Hospital of Patras «St Andreas»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μοριακή βάση του σαρκώματος Ewing's είναι η αμοιβαία διαμετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 11 και 22 που οδηγεί στην σύντηξη του EWS με το FLI1 γονίδιο με αποτέλεσμα την δημιουργία υβριδικού ογκοπρωθητικού γονιδίου που κωδικοποιεί τον έκτοπο EWS/FLI πανίσχυρο μεταγραφικό παράγοντα. Η νόσος είναι εξαιρετικά χήμειο-άκτινο-ευαίσθητη καθώς τήκεται δίκην χιόνος, αλλά στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων υποτροπιάζει και οδηγεί με μαθηματική ακρίβεια στο θάνατο. Το υβριδικό EWS/FLI ογκοπρωθητικό γονίδιο αποτελεί τον ιδεώδη στόχο τόσο για την πληρέστερη κατανόηση της αιτιοπαθογένειας και για την διαγνωστική της νόσου όσο και για τον σχεδιασμό καινοτόμων θεραπευτικών μεθόδων.

Λέξεις κλειδιά: Σαρκώμα Ewing's, EWS/FLI υβριδικό ογκοπρωθητικό γονίδιο, μοριακή αιτιοπαθογένεια & διαγνωστική

ABSTRACT

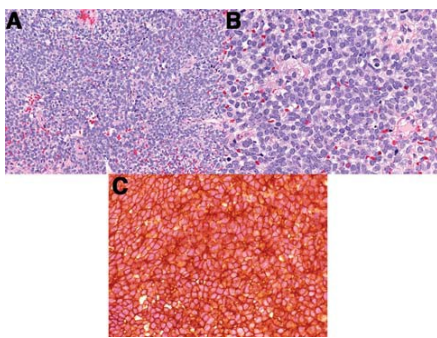
Most cases of Ewing's sarcoma are the result of a translocation between chromosomes 11 and 22, which fuses the EWS gene of chromosome 22 to the FLI1 gene of chromosome 11 and as a result generates an aberrant transcription factor. EWS/FLI functions as the master regulator in the molecular pathology of Ewing's sarcoma. The tumor has a unique property of being highly sensitive to chemotherapy and radiation, sometimes acknowledged by the phrase "melting like snow", but the main drawback is that it inevitably recurs dramatically after some time. From that point of view, the EWS/FLI fusion hybrid represents an ideal target for molecular diagnosis and treatment of Ewing's sarcoma.

Keywords: Ewing's sarcoma, EWS/FLI fusion hybrid, molecular aetiology & diagnosis

Εισαγωγή

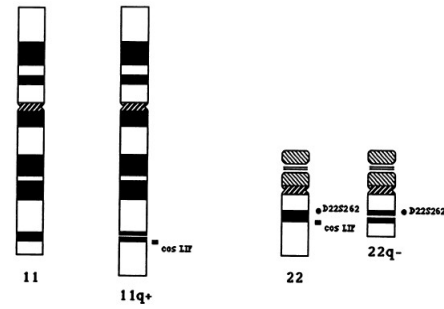
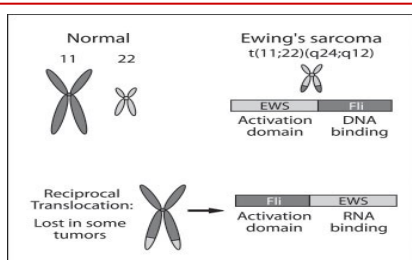
Το σάρκωμα Ewing είναι ένα ιστολογικά ετερογενές κακόηθες νεόπλασμα το οποίο παθολογοανατομικά ανήκει στην ομάδα των νεοπλασμάτων που αποτελούνται από μικρά στρογγυλά νεοπλασματικά κύτταρα χρώματος κυανού (small round blue cell tumors)¹⁻³.

Η ανοσοϊστοχημεία για την έκφραση της p30/32^{MIC2} (CD99) γλυκοπρωτεΐνης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των νεοπλασματικών κυττάρων είναι θετική σε ποσοστό 95% -100% των περιπτώσεων της νόσου⁴⁻⁹.



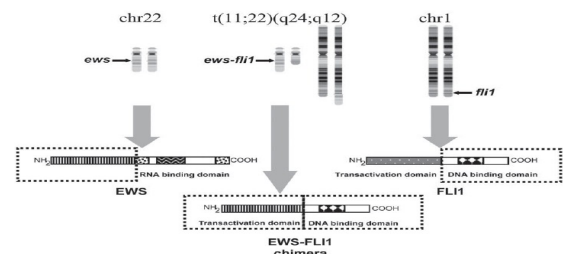
Εικόνα 1. Α Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης x 200 μεγένθυση, Β Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης x 400 μεγένθυση, C Χρώση ανοσοπεροξειδάσης x 400 μεγένθυση, έντονη θετική ανοσοχρώση για την p30/32^{MIC2} (CD99) με το μονοκλωνικό αντίσωμα O13

Ως πιθανότερο κύτταρο προέλευσης θεωρείται το πολυδύναμο μεσεγχυματικό κύτταρο του μυελού των οστών ή κάποιο αρχέγονο πρόδρομο κύτταρο αυτού το οποίο υπόκειται σε πρώιμη αναστολή της διαφοροποίησής του¹⁰⁻²⁴. Ποσοστό ≥ 95% των σαρκωμάτων Ewing φέρουν την ισορροπημένη αμοιβαία χρωμοσωματική διαμετάθεση t(11;22)(q24;q12) η οποία είναι παθογνωμονική της νόσου και η οποία θεωρείται ως το πρωτεύον εναρκτήριο μοριακό σύμβαμα που οδηγεί σε νεοπλασματική εξαλλαγή το πρόδρομο αρχέγονο πολυδύναμο μεσεγχυματικό κύτταρο του μυελού των οστών²⁵⁻²⁸.



Εικόνα 2. Η διαμετάθεση, ως αμοιβαία, οδηγεί σε δύο γονίδια σύντηξης (EWS/FLI1 στο χρωμόσωμα 22 και FLI1/EWS στο χρωμόσωμα 11). Το γονίδιο σύντηξης στο χρωμόσωμα 22 εκφράζει νεοπλασματικό φαινότυπο. Το γονίδιο σύντηξης στο χρωμόσωμα 11 δεν επιδρά στο φαινότυπο

Η εν λόγω διαμετάθεση οδηγεί στη σύντηξη του γονιδίου EWSR1 με το γονίδιο FLI1 με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός καινού, εντός κωδικοποιητικού πλαισίου (in-frame) υβριδικού EWSR1-FLI1 γονιδίου σύντηξης στο χρωμόσωμα 22^{29,30}. Αναλυτικότερα το 3' ήμισυ του γονιδίου FLI1 (friend leukemia virus integration site 1) το οποίο εδράζεται φυσιολογικά στη θέση 11q24, διαμετατίθεται και συντήκεται με το 5' ήμισυ του γονιδίου EWSR1 το οποίο εδράζεται φυσιολογικά στη θέση 22q12³¹⁻³³.



Εικόνα 3. Γονιδιακή σύντηξη και δημιουργία της χιμαιρικής πρωτεΐνης

Το υβριδικό EWSR1-FLI1 γονίδιο κωδικοποιείται από τα εξώνια 1 – 7 του EWSR1 και από τα εξώνια 6 – 9 του FLI1 και η σύντηξη διαμεσολαβείται με την σύνδεση του εξωνίου στο 3' τελικό άκρο του EWSR1 γονιδίου με το εξώνιο στο 5' τελικό άκρο του FLI1 γονιδίου^{33,34}. Η ανάλυση της DNA αλληλουχίας των προϊόντων της διαμετάθεσης έχει αναδείξει τουλάχιστον 8 διαφορετικούς τύπους υβριδικών μεταγραφημάτων ανάλογα με τις ακριβείς θέσεις τμήσης – ματίσματος (breakpoints) των FLI1 και EWSR1 εξωνίων που συμπεριλαμβάνονται εντός των χιμαιρικών γονιδίων. Ο πλέον συχνός τύπος σύντηξης αναφέρεται ως σύντηξη τύπου 1,

παρατηρείται σε ποσοστό 63% των περιπτώσεων και αφορά τη σύντηξη μεταξύ εξωνίου 7 της EWS και εξωνίου 6 της FLI1³⁵.

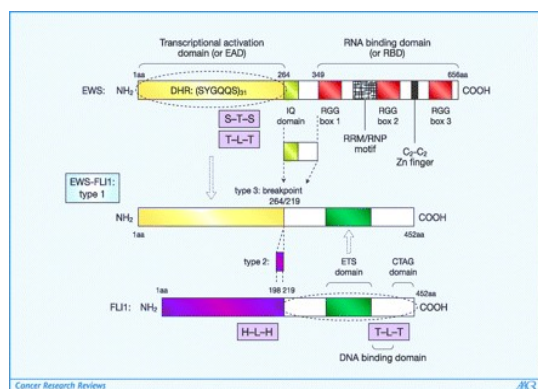
Το EWSR1 γονίδιο κωδικοποιεί την έκφραση πρωτεΐνης η οποία συνδέεται με το RNA. Η EWSR1 πρωτεΐνη φέρει στο καρβόξυ-τελικό άκρο μία λειτουργικά εξειδικευμένη περιοχή για σύνδεση με το RNA (C-terminus RNA binding domain) και στο άμινο-τελικό άκρο λειτουργικά εξειδικευμένη-ες περιοχή-ές για ενεργοποίηση της μεταγραφής (N-terminus transcriptional activation domain-s)³⁶. Η EWS N-terminal domain αποτελείται από τα κατάλοιπα αμινοξέων 1 έως και 264 τουλάχιστον, περιέχει 31 εκφυλισμένες εξαπεπτιδικές επαναλήψεις (degenerate hexapeptide repeats DHR) καθώς και 7 κατάλοιπα τυροσίνης. Δευτεροταγείς δομές της άμινο-τελικής περιοχής (T-L-T/S-T-S) διαθέτουν τόσο ενεργοποιητική όσο και ρυθμιστική δράση και είναι υπεύθυνες για αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Η EWS C-terminal domain αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 349 έως και 656 και περιέχει μία διακριτή, ξεχωριστή, υψηλά συντηρημένη συναινετική επαναληπτική αλληλουχία ριβονουκλεοπρωτεΐνης – αναγνώρισης του RNA (RNA recognition motif - ribonucleoprotein consensus sequence motif RRM/RNP domain) μήκους 87 αμινοξέων που απαντάται στην πλειονότητα των RNA-binding πρωτεϊνών και η οποία περιέχει ικανό αριθμό επαναλήψεων RGG (αργινίνης-γλυκίνης-γλυκίνης) που με τη σειρά τους διευκολύνουν τη σύνδεση της πολυπεπτιδικής αλύσου με τη μονή έλικα νουκλεϊνικών οξέων. Η EWSR1 πρωτεΐνη ανήκει στην υπο-ομάδα της TET οικογενείας των RNA-binding πρωτεϊνών. Η EWSR1 πρωτεΐνη κωδικοποιείται από γονίδιο ζωτικών λειτουργιών (house-keeping gene) καθώς εκφράζεται ενιαία, ευρέως και πανταχού παρών (ubiquitously) σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα όλων των ειδών, η έκφρασή της είναι ποσοτικά σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ παράλληλα το m-RNA αυτής έχει μακρό χρόνο ημίσειας ζωής. Το μεταγραφικό δυναμικό της N-terminal domain της EWSR1 υποδηλώνει ότι η EWSR1 έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα^{2,36}.

Το FLI1 γονίδιο αποτελεί μέλος της οικογένειας των ETS μεταγραφικών παραγόντων και κωδικοποιεί μεταγραφικό παράγοντα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες της

οικογενείας ETS, σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συμπαράγοντες (cofactors) στο πλαίσιο λειτουργίας του μεταγραφικού συμπλέγματος, ενεργοποιούν ποικιλία ειδικών γονιδίων-στόχων όπως ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως η απόπτωση, η αγγειογένεση, η ιστική διείσδυση και η κυτταρική διαφοροποίηση. Οι ETS μεταγραφικοί παράγοντες φέρουν στην καρβόξυ-τελική περιοχή τους, λειτουργικές περιοχές (domains) με ειδικότητα σύνδεσης με τις σχετικές (cognate) προς αυτές DNA αλληλουχίες. Η εν λόγω εξειδικευμένη περιοχή (domain) είναι υψηλά συντηρημένη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και αναγνωρίζει ένα βασικό εσωτερικό τμήμα (core) μιάς επαναλαμβανόμενης (motif) DNA αλληλουχίας. Η FLI1 πρωτεΐνη είναι μεταγραφικός παράγοντας του οποίου το άμινο-τελικό άκρο εκτείνεται από τα αμινοξέα 1 έως και 198 και περιέχει μία άμινο-τελική δια-ενεργοποιητική περιοχή (N-terminus transactivating region NTA) ενώ το καρβόξυ-τελικό άκρο εκτείνεται από τα αμινοξέα 219 έως και 452 και περιέχει μία καρβόξυ-τελική δια-ενεργοποιητική περιοχή (C-terminus transactivating region CTA). Εντός της CTA περιοχής περικλείεται υψηλά συντηρημένη ETS-type ειδική αλληλουχία με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain)^{2,37,38}.

Το υβριδικό μεταγράφημα έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση μιας χιμαιρικής υβριδικής ογκογόνου πρωτεΐνης η οποία αποτελείται από την άμινο-τελική (N-terminal) δια-ενεργοποιητική (transactivation) περιοχή (domain) της EWS πρωτεΐνης και από την καρβόξυ-τελική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (C-terminal DNA binding domain) της FLI1 πρωτεΐνης. Ουσιαστικά στην υβριδική EWSR1-FLI1 της t(11;22)(q24;q12) διαμετάθεσης η RNA-binding motif του καρβόξυ-τελικού άκρου της EWSR1 αντικαθίσταται από την καρβόξυ-τελική DNA-binding domain της FLI1. Από την άλλη μεριά, η αντικατάσταση της άμινο-τελικής φυσικής ενεργοποιητικής της μεταγραφής περιοχής (N-terminal native transcription activation domain) της FLI1 από την άμινο-τελική ενεργοποιητική της μεταγραφής περιοχή της EWS προσδίδει στην FLI1 νέο πολλαπλάσιο υψηλότατο δυναμικό ενεργοποίησης της

μεταγραφής με αποτέλεσμα την μετατροπή της FLI1 από non-transforming activator μεταγραφικό παράγοντα σε transforming activator μεταγραφικό παράγοντα-ογκοπρωτεΐνη. Η χμιαϊκή υβριδική πρωτεΐνη η οποία προέρχεται από την σύντηξη τύπου 1 εμφανίζει την σύνδεση ανάμεσα στα κατάλοιπα αμινοξέων 264 της EWS και 219 της FLI1. Στις ολιγότερο συχνά παρατηρούμενες συντήξεις τύπου 2 ή 3 λαμβάνει χώρα επιπρόσθετη εισαγωγή 22 ή 84 αμινοξέων από την FLI1 ή την EWS αντίστοιχα².



Εικόνα 4. Πρωτοπαγής αλληλουχία της χμιαϊρας σε εναλλακτικές μορφές σύντηξης

Η χμιαϊκή υβριδική EWSR1-FLI1 πρωτεΐνη μπορεί υπόκειται σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, φωσφορλίωση ή O-GlcN-ακυλίωση), αλλά η σημασία αυτών των περαιτέρω τροποποιήσεων στην ογκογόνο δράση της δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί³⁹⁻⁴¹.

Η υβριδική EWSR1-FLI1 πρωτεΐνη εμφανίζει πρωτίστως γονιδιωματική (genomic) δράση παρεκτρέποντος χμιαϊκού μεταγραφικού παράγοντα με την αμινοτελική EWSR1-derived περιοχή του να έχει δράση ρυθμιστική της μεταγραφής (N-terminal transcriptional regulatory domain) και την καρβοξυτελική FLI1-derived περιοχή του να φιλοξενεί περιοχή με ειδικότητα πρόσδεσης στο DNA (C-terminal ETS DNA-binding domain). Η υβριδική EWSR1-FLI1 πρωτεΐνη έχει διττή γενωμική τροποποιητική δράση τόσο ενεργοποιητική όσο και κατασταλτική της μεταγραφής. Ανάλυση με μικροσυστοιχίες έχει ταυτοποιήσει περισσότερα από 1000 γονίδια στόχους τα οποία ρυθμίζονται από την EWSR1-FLI1, εκ των οποίων το 80% υπόκειται σε καταστολή και το 20% σε ενεργοποίηση⁴².

Η δράση της EWSR1 ως ενεργοποιητική της μεταγραφής (transcriptional activator) και της FLI1 ως προσδετικής στο DNA (DNA-binding domain) είναι πιθανότατα υπεύθυνες για τις συνδυαστική διττή ενεργοποιητική/κατασταλτική δράση της χμιαϊκής πρωτεΐνης.

Ωστόσο, προκειμένου να φέρουν εις πέρας τη μεταγραφική δράση τους, οι EWS-ETS πρωτεΐνες, απαιτείται η συνύπαρξη επιπρόσθετων επικουρικών πρωτεϊνών οι οποίες στο σύνολό τους συνθέτουν την μεταγραφική μηχανή (transcriptional machinery).

Τα γονίδια στόχοι της EWSR1-FLI1 κατηγοριοποιούνται είτε ως άμεσοι στόχοι, δηλαδή γονίδια των οποίων ο μεταγραφικός υποκινητής promoter αποτελεί στόχο της EWSR1-FLI1, είτε ως έμμεσοι στόχοι, δηλαδή γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται έμμεσα καθώς ενέχονται σε απώτερους οδούς μεταβίβασης σήματος και σε απώτερα δίκτυα γονιδιακής ρύθμισης τα οποία έχουν ως πρότερο εναρκτήριο καταλυτικό βήμα την δράση της EWSR1-FLI1. Συνεπώς η πρωτεύουσα δράση της EWSR1-FLI1 είναι γονιδιωματική άμεση ή έμμεση και επαγωγική ή κατασταλτική επί της μεταγραφής^{2,3,36,43-54}.

Πίνακας 1. Συνοπτική παρουσίαση της άμεσης και έμμεσης διττής (ενεργοποιητικής / κατασταλτικής) γενετικής δράσης της EWSR1-FLI1.

Regulation	Gene name
(A) Direct targets	
Upregulated	RPB7/POLR2G, TNC, UPP1, ID2, TERT, PTPN13/PTPN13, PLD2, MK-STYX, GLI1, Aurora A and B
Downregulated	p21/CDKN1A, TGFB2, IGFBP3
(B) Indirect targets	
Upregulated	EAT-2/SH21B, MFNG, UBE2C, CCND1, MAPT, PP1R1A, NEK2, MYC, PIM3, NKX2-2, CCK, CAV1, CD99, VEGF-A, EZH2, TOPK/PBK, IGF1/IGF1R, DAX1/NROB1
Downregulated	p27/CDKN1B, p57/CDKN1C, ZYX, NOTCH-p53, thrombospondin 1 and 2

Στην περίπτωση των άμεσων μεταγραφικών στόχων της EWSR1-FLI1, κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες DNA και πιο συγκεκριμένα οι μικροδορυφορικές GGAA επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (motifs)⁵⁵⁻⁵⁸. Η ικανότητα της EWSR1-FLI1 να συνδέεται με το DNA και η ισχύς της μεταγραφικής ενεργοποίησης που δύναται να επάγει η EWSR1-FLI1 βασίζεται στο πλήθος των εξακολουθητικών επαναληπτικών GGAA motifs στον εκκινητή promoter στόχο.

Οι υποκινητές (promoters) των γονιδίων που αποτελούν άμεσους μεταγραφικούς στόχους υπερέκφρασης από την EWSR1-FLI1 είναι

εμπλουτισμένοι σε μικροδορυφορικές GGAA επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ αντίθετα οι υποκινητές των γονιδίων που αποτελούν άμεσους μεταγραφικούς στόχους καταστολής της έκφρασης από την EWSR1-FLI1 είναι πτωχοί σε μικροδορυφορικές GGAA επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες⁵⁵⁻⁵⁸.

Η υβριδική EWSR1-FLI1 πρωτεΐνη επάγει την υπερέκφραση γονιδίων που ενέχονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην κυτταρική επιβίωση. Έχουν αναγνωρισθεί γονίδια στόχοι της EWSR1-FLI1 τα οποία υπερεκφράζονται είτε ως άμεσοι στόχοι (hsRPB7/POLR2G, UPP1, TNC, tenascin-C, Id2, PTPL1/PTPN13, PLD2 phospholipase D2, MK-STYX, TERT, GLI1, Aurora A και B, DAX1/NR0B1, glutathione S-transferase M4 GSTM4, IGF1, TERT, STYXL1) είτε ως έμμεσοι στόχοι (EAT-2/SH21B, MFNG, UBE2C, cyclin D1 CCND1, MAPT, PP1R1A, NEK2, c-MYC, PIM3, NKX-2.2, cholecystokinin CCK, PDGFR, CAV1, CD99, VEGF-A, EZH2, TOPK/PBK, IGF1/IGF1R, Bcl-2, SOX2, Skp-2, caveolin-1, και mTOR, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT signaling pathway)^{2,3,42,59-94}.

Πίνακας 2. Γονίδια τα οποία υπερεκφράζονται ως άμεσοι στόχοι της EWSR-FLI1 χίμαιρας

RPB7/POLR2G TNC	Transactivation of EWS/FLI1 Invasiveness, remodeling of cancer stroma
UPP1 ID2	RAS-mediated signaling Cell cycle progression (inactivation of RB family), inhibition of precursor cells differentiation into a certain lineage
TERT PTPL1/PTPN13 PLD2	Expression does not correlate with survival Protein dephosphorylation, oncogenesis PDGF-mediated signaling, cell growth promot
STYXL1	Regulation of MAP kinases, antagonization of cell survival.
IGF1	Cell proliferation, survival
NR0B1	Transcriptional repressor

Πίνακας 3. Γονίδια τα οποία υπερεκφράζονται ως έμμεσοι στόχοι της EWSR-FLI1 χίμαιρας

EAT-2/SH21B MFNG UBE2C CCND1 MAPT	Oncogenesis Tumorigenesis Cell cycle regulation Cell proliferation, cell survival Neural crest development and neuronal differentiation
PP1R1A NEK2	Cell cycle regulation Centrosome regulator
MYC	Cell proliferation, cell survival
PIM3	Mediator of EWS/ETS tumorigenesis
NKX2-2	Oncogenic transformation Neural crest development and neuronal differentiation
CCK PDGFR CAV1	Cell proliferation, neural marker Motility and growth Oncogenic phenotype and tumorigenicity (low Snail expression levels, allowing E-cadherin expression)
CD99	Homotypic cell adhesion
EZH2	Caspase-independent cell death Cellular growth (controlled by Rb-E2F pathway)
TOPK/PBK	Cell proliferation

Παράλληλα η EWSR1-FLI1 καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που ενέχονται στην απόπτωση και στη αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest).

Έχουν αναγνωρισθεί γονίδια στόχοι της EWSR1-FLI1 των οποίων η έκφραση καταστέλλεται είτε ως άμεσοι στόχοι (p21^{WAF1/CIP1} p21/CDKN1A, TGFBR2, IGFBP3) είτε ως έμμεσοι στόχοι (p27^{kip} /CDKN1B, p57/CDKN1C p57^{kip}, zyxin ZYX, NOTCH-p53, thrombospondin 1 και 2). Για παράδειγμα, η μείωση της έκφρασης της p21^{WAF1/CIP1} p21/CDKN1A επιτυγχάνεται άμεσα με αρνητική μεταγραφική ρύθμιση καθώς ο υποκινητής της p21^{WAF1/CIP1} p21/CDKN1A φέρει τουλάχιστον δύο περιοχές με εξειδίκευση πρόσδεσης για την EWSR1-FLI1 (ETS binding-sites)^{2,3,95-119}.

Πίνακας 4. Γονίδια των οποίων η έκφραση καταστέλλεται ως άμεσοι στόχοι της EWSR-FLI1 χίμαιρας

p21/CDKN1A	Regulation of G1-S transition, escape from apoptosis and growth inhibition
TGFBR2	Cell proliferation
IGFBP3	Cell apoptosis (IGF-1-dependent and -independent pathways)

Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων του αναστολέα p27 των κύκλινο-εξαρτώμενων κινασών επιτυγχάνεται εμμέσως, μέσω ενεργοποίησης της αποικοδόμησης του p27^{kip} /CDKN1B από την καταβολική οδό του πρωτεασώματος.

Πίνακας 5. Γονίδια των οποίων η έκφραση καταστέλλεται ως έμμεσοι στόχοι της EWSR-FLI1 χίμαιρας

p27/CDKN1B	Prevention of senescence (Skp2-mediated 26S proteasome degradation)
p57/CDKN1C	Escape from apoptosis and growth inhibition. Blockade of cell proliferation (G1 arrest)
ZYX	Actin cytoskeleton-associated protein

Κομβικής σημασίας στην έμμεση μεταγραφική κατασταλτική δράση που επάγεται από την EWSR-FLI1 χίμαιρα, αναδεικνύεται η έμμεση μεταγραφική επίδραση της EWSR1-FLI1 στην υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NKX-2.2, ο οποίος με τη σειρά του δρά ως καταστολέας της έκφρασης πλήθους γονιδίων έμμεσων στόχων της EWSR1-FLI1.

Ο NKX-2.2 καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση αφ' ενός μεν μέσω άμεσης πρόσδεσης σε υποκινητές, αφ' ετέρου δε μέσω στρατολόγησης αποακετυλασών των ιστονών

και TLE συνεργατικών καταστολέων (Transducin-Like Enhancer of split co-repressor proteins)^{64,120}.

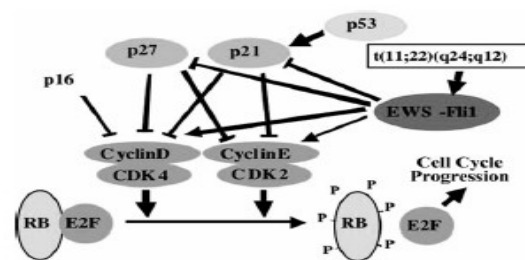
Η επακόλουθη διαταραχή της ρύθμισης της μεταγραφής έχει ως αποτέλεσμα την ογκογένεση του σαρκώματος Ewing. Δεδομένου ότι, η EWSR1-FLI1 χίμαιρα δρά στα πλαίσια ενός ευμεγέθους πολυπρωτεϊνικού μεταγραφικού συμπλέγματος, βασίζεται, όπως και οι λοιποί μεταγραφικοί παράγοντες, σε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών.

Συνεπώς, προκειμένου η EWSR1-FLI1 χίμαιρα, να φέρει εις πέρας τη μεταγραφική της δράση, έχει ανάγκη από τη συνεργατική δράση και άλλων πρωτεϊνών (co-partners).

Για παράδειγμα η RNA ελικάση τύπου A έχει τεκμηριωθεί ως συνεργατική πρωτεΐνη – συνεργατικός μεταγραφικός παράγοντας (protein partner – transcriptional cofactor) της EWSR1-FLI1^{121,122}.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκογόνου μεταγραφικής δράσης της EWSR1-FLI1 χίμαιρας αποτελεί η περίπτωση όπου η EWSR1-FLI1 υβριδική πρωτεΐνη επηρεάζει την έκφραση των μορίων που ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ειδικότερα στον έλεγχο της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S. Ειδικότερα επάγει την έκφραση των κυκλινών της φάσης G1 και συγκεκριμένα της κυκλίνης D1 και της κυκλίνης E, ενώ παράλληλα αναστέλλει την έκφραση των p27 και p21 αναστολέων των κυκλίνο-εξαρτώμενων κινασών CDK4 και CDK2 που προωθούν την μετάβαση από την φάση G1 στη φάση S.

Η διαταραχή της ισορροπίας υπέρ του συμπλέγματος κυκλινών/ κυκλίνο-εξαρτώμενων κινασών έναντι των p27 και p21 CDK αναστολέων, έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση των p53 και Rb ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η αδρανοποίηση της p53 επιτυγχάνεται τουλάχιστον σε ένα βαθμό έμμεσα μέσω αναστολής της έκφρασης της p21 που είναι η πρωτεΐνη διαμέσου της οποίας διαμεσολαβείται η δράση της p53, ενώ η αδρανοποίηση της Rb επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής της υπερφωσφορυλίωσής της με απώτερο επακόλουθο την απελευθέρωση μεταγραφικών παραγόντων της οικογενείας E2F και ειδικότερα του E2F1.

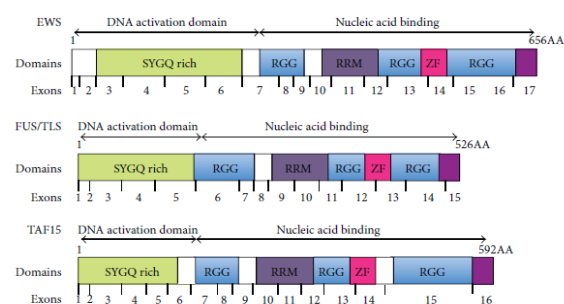


Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης δράσης της EWSR-FLI1 χίμαιρας στην μετάβαση από την φάση G1 στη φάση S

Ο απελευθερωμένος E2F1 μεταγραφικός παράγοντας μαζί με την DP1 συνδεδεμένη σε αυτόν πρωτεΐνη (binding partner) ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπέθυνες για την αντιγραφή του DNA (DNA πολυμεράση, θυμιδική κινάση, δι-ύδρο-φολική αναγωγάση, cdc6) και την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων (MCM5 και replication origin-binding protein HsOrc1). Επιπλέον η EWSR1-FLI1 υβριδική πρωτεΐνη επάγει την έκφραση του αναστολέα (inhibitor) του γονιδίου τύπου 2 πρόσδεσης στο DNA (DNA binding 2 [Id2] gene), με αποτέλεσμα την διασφάλιση της περαιτέρω μετάβασης του κυττάρου από τη φάση S στη φάση G2 και την αποφυγή της απόπτωσης κατά την φάση S μέσω της αναστολής της έκφρασης των E πρωτεϊνών της οικογενείας των ETS μεταγραφικών παραγόντων. Το τελικό αποτέλεσμα της EWSR1-FLI1 σύντηξης είναι η συνεχής μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S, ο μη-ελεγχόμενος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αποφυγή της απόπτωσης που οδηγούν σε νεοπλασματική εξαλλαγή¹²³⁻¹³¹.

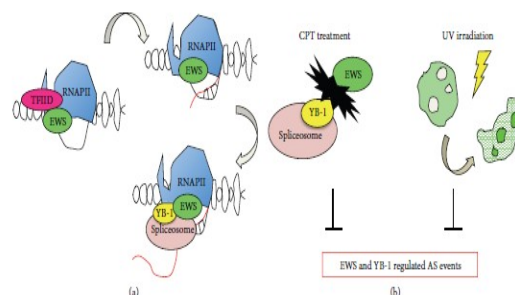
Η πλειονότητα των μελετών έχει τεκμηριώσει ότι το δυναμικό νεοπλασματικής εξαλλαγής της EWSR1-FLI1 χίμαιρας οφείλεται στην πολλαπλάσια ενίσχυση του μεταγραφικού δυναμικού του ETS/FLI1 DNA-binding domain καρβόξυ-τελικού τμήματος αυτής. Ωστόσο υπάρχουν πλέον δεδομένα που παράλληλα αναδεικνύουν ως σημαντικό και το ρόλο του EWSR1 transactivation domain άμινο-τελικού τμήματος της EWSR1-FLI1, καθώς φαίνεται ότι και η δράση της EWSR1 τροποποιείται σαν αποτέλεσμα της σύντηξής της με την ETS/FLI1 με τελικό αποτέλεσμα η δράση της EWSR1-FLI1 να λαμβάνει χώρα τόσο σε μεταγραφικό, όσο και σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο. Αναλυτικότερα, και η άμινο-τελική EWSR1 transactivation domain επηρεάζεται από τη σύντηξή της με την κάρβοξυ-τελική ETS/FLI1

DNA-binding domain και ως αποτέλεσμα αυτής της σύντηξης, η βιολογική δράση της άμινο-τελικής EWSR1 transactivation domain παρεκτρέπεται ως δράση παράγοντος ανασταλτικού του ματίσματος του RNA. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η υβριδική EWSR1-FLI1 πρωτεΐνη πέρα από την πρωτεύουσα γενωμική (genomic) δράση παρεκτρέποντος χιμαιρικού μεταγραφικού παράγοντα, να εμφανίζει και δευτερεύουσα μετα-μεταγραφική (post-transcriptomic) δράση παρεκτρέποντος παράγοντα ματίσματος του RNA (aberrant RNA splicing factor) αναστέλλοντας το διαμεσολαβούμενο από U1C-, TASR- και YB1- μάτισμα του RNA. Με τον τρόπο αυτό η EWSR1-FLI1 δρά και ως παρεκτρέπων παράγον της οικογενείας TET (TET family of proteins: translocated in liposarcoma TLS, Ewing's sarcoma EWS, TATA-binding protein-associated factor 15 TAF15) ο οποίος τροποποιεί τη γονιδιακή έκφραση στο μετα-μεταγραφικό στάδιο της επεξεργασίας RNA-processing-splicing του πρωτογενούς RNA μεταγραφήματος. Συνεπώς η EWSR1-FLI1 χίμαιρα δύναται να συνεισφέρει στη νεοπλασματική εξαλλαγή και μέσω αναστολής του RNA splicing εντάσσοντας με τον τρόπο αυτό, εκτός από τον πρωτεύοντα μηχανισμό της γονιδιακής μεταγραφής και την αναστολή του RNA splicing ως δευτερεύοντα μηχανισμό μετα-μεταγραφικού ελέγχου στην παθογένεια του σαρκώματος Ewing^{2,29,132-138}.



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτοταγούς αλληλουχίας των πρωτεϊνών της οικογενείας TET. Απεικονίζονται η άμινο-τελική διενεργοποιητική περιοχή (DNA trans-activation domain) και η καρβόξυ-τελική περιοχή με ειδικότητα πρόσδεσης στο νουκλεϊνικό οξύ (nucleic acid binding domain). Καταδεικνύονται περιοχές: α. πλούσιες σε SYGQ (σερίνη-τυροσίνη-γλυκίνη-γλουταμίνη), β. με ικανότητα πρόσδεσης στο RNA (RNA binding) και πλούσιες σε RGG (αργινίνη-γλυκίνη-γλυκίνη-), γνωστές ως RGG boxes γ. με δισουλφιδικούς δεσμούς κυστεΐνης και δακτύλους ψευδαργύρου Cys2-Cys2 zinc finger (ZF) δ. με ικανότητα αναγνώρισης του RNA οι οποίες περιγράφονται με τα αρχικά RRM (RNA Recognition Motif)

Έχει περιγραφεί πλήθος πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται και αλληλεπιδρούν είτε με την DNA binding domain (hsRBP7 / RNAPII, UIC, ZFM1, CBP, PYK2), είτε με την nucleic acid binding domain (YB-1, SR proteins, PRMT1, TFIID, p68) της EWS και εν γένει των πρωτεϊνών της οικογενείας TET¹³².



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης (cross-talk) ανάμεσα στους μηχανισμούς μεταγραφής και ματίσματος που διαμεσολαβούνται από τις RNAPII, EWS και YB-1. α. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η EWS συνδέεται με το προ-εναρκτήριο TFIID σύμπλεγμα, με την RNAPII καθώς και με τις ειδικά σχετιζόμενες γενετικές περιοχές της υποψήφιας προς μεταγραφή περιοχή. Με την έναρξη της μεταγραφής η EWS επικάθεται επί του νεοσηματισθέντος RNA προωθώντας με τον τρόπο αυτό διαφορετικές επιλογές εναλλακτικού ματίσματος AS (Alternative Splicing). β. Η καμπτοθεκίνη και η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλούν αποσύνδεση της EWS από την YB-1 και το Spliceosome, αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό την φυσιολογική ρυθμιστική επίδραση της EWS στο εναλλακτικό μάτισμα. Η υβριδική σύντηξη της EWSR/TET με την FLI-1/ETS στο σάρκωμα Ewing πιθανότατα με τον ίδιο μηχανισμό οδηγεί επίσης σε αναστολή της φυσιολογικής ρυθμιστικής επίδρασης της EWS στο εναλλακτικό μάτισμα¹³².

Πέρα από την άμεση ή έμμεση πρωτεύουσα γονιδιωματική (genomic) δράση της και την δευτερεύουσα μετα-μεταγραφική (post-transcriptomic) ανασταλτική του RNA-splicing δράση της, η EWSR1-FLI1 εμφανίζει και τριτεύουσα πρωτεομική (proteomic) δράση η οποία συνίσταται σε διαταραχή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης και της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης πλήθους πρωτεϊνών όπως πυρηνικών πρωτεϊνών, ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και ρυθμιστών του μεταβολισμού. Αναλυτικότερα έχει τεκμηριωθεί αύξηση της συγκέντρωσης των HSP90, IGF1, TERT, HSP και B7 υπομονάδας της RNA πολυμεράσης τύπου II, αλλά και μείωση της συγκέντρωσης των aa-tRNA συνθετάσης, πολυριβοσωμικού συστατικού, φωσφατάσης σερίνης/θρεονίνης, ισομερασών, υπομονάδος

πρωτεασώματος και υποδοχέα INF
άλφα/βήτα^{2,29,139-146}.

Πίνακας 6. Πρωτεΐνες των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται ως αποτέλεσμα δευτερεύουσας πρωτομικής δράσης της EWSR-FLI1 χίμαιρας

RNA polymerase II subunit B7	Transcription
HSP90	Protein folding
IGF1	Growth factor activity
TERT	RNA binding
HSP, various	Protein folding

Πίνακας 7. Πρωτεΐνες των οποίων η συγκέντρωση ελαττώνεται ως αποτέλεσμα δευτερεύουσας πρωτομικής δράσης της EWSR-FLI1 χίμαιρας

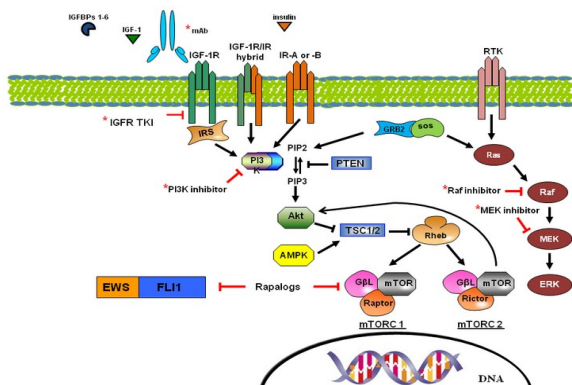
aa-tRNA synthetase	Regulation of cell proliferation
Polyribosome component	Regulation of cell growth
Ser/Thr phosphatase	Cell cycle, cell division
Isomerases	mRNA processing, protein folding
Proteasome subunit	Protein catabolic process
IFNalpha/beta receptor	Induction of apoptosis

Η χιμαιρική EWSR1-FLI1 διαντιδρά με πλήθος πρωτεϊνών σε διάφορα στάδια όπως με κινάσες και φωσφατάσες κατά τη διάρκεια μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, με TATA box-binding πρωτεΐνες, με την RNA πολυμεράση, με συν-ενεργοποιητές όπως η p300 καθώς και με πλήθος άλλες συνεργατικές πρωτεΐνες και παράγοντες του μεταγραφικού συμπλέγματος. Αυτό σημαίνει ότι η EWSR1-FLI1 έχει ανάγκη και τη συνεργασία πλήθους άλλων πρωτεϊνών όπως οι AP-1, Fos-Jun, RNA helicase-A πρωτεΐνες, προκειμένου να φέρει εις πέρας τη νεοπλασματική εξαλλαγή του κυττάρου. Για παράδειγμα στην περίπτωση της p300 η σύνδεσή της με την EWSR1-FLI1 προκαλεί επιπροσθέτως και αδρανοποίηση της δράσης της p300 ως ακέτυλο-τρανσφεράσης των ιστονών^{42,121,122,147-149}. Επιπλέον, όσον αφορά στην p53, έχει παρατηρηθεί ότι η EWSR1-FLI1 προκαλεί εξασθένιση της δράσης της. Είναι αξιοσημείωτο ότι, στους ασθενείς με σάρκωμα Ewing, η επίπτωση των μεταλλάξεων της p53 είναι πολύ μικρή καθώς η λειτουργικότητα των οδών μεταβίβασης σήματος όπου ενέχεται η p53 παραμένει άθικτη. Συνεπώς η παρατηρούμενη αδρανοποίηση της p53 πιθανότατα διαμεσολαβείται μέσω αναστρέψιμου μετα-μεταφραστικού μηχανισμού. Η υβριδική EWSR1-FLI1 αναστέλλει τη δράση της wild type p53 είτε με έμμεσο μηχανισμό μέσω της Notch οδού μεταβίβασης σήματος, είτε με άμεσο μηχανισμό μέσω πρόκλησης

συσσώρευσης μορίων p53 περίξ της EWSR1 περιοχής της υβριδικής πρωτεΐνης και δημιουργίας πολυ-πρωτεϊνικού EWSR1-(p53)_n συμπλέγματος με επακόλουθο την αδρανοποίηση των συσσωρευμένων μορίων p53 και με τον τρόπο αυτό την μείωση των διαθέσιμων κυτταρικών λειτουργικών αποθεμάτων p53¹⁵⁰⁻¹⁵². Τελικό αποτέλεσμα είναι η μειωμένη έκφραση της p21^{WAF1/CIP1} και η επακόλουθη απελευθέρωση των μιτογόνων συμπλεγμάτων CyclinD/CDK4 και CyclinE/CDK2. Η διαμεμβρανικά παρεμβαλλόμενη p30/32^{MIC2} (CD99) γλυκοπρωτεΐνη εκφράζεται σε ποσοστό 95% -100% στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και η θετική ανοσοϊστοχημική χρώση θεωρείται χαρακτηριστική της παθολογοανατομικής διαγνώσεως του σαρκώματος Ewing. Η έκφραση της CD99 επάγεται από την EWSR1-FLI1, αλλά η δράση της CD99 είναι επί του παρόντος άγνωστη. Ωστόσο πιθανολογείται ότι η CD99 αναστέλλει την τελική νευρωνική διαφοροποίηση μέσω ελάττωσης της δραστηριότητας της οδού μεταβίβασης σήματος των MAP κινασών. Η σύζευξη της CD99 με anti-CD99 μονοκλωνικά αντισώματα έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή, μη-διαμεσολαβούμενης από κασπάσες, απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές σαρκώματος Ewing⁴⁻⁹.

Ωστόσο επειδή μόνη η EWSR1-FLI1 διαμετάθεση δεν αρκεί για την in vitro νεοπλασματική εξαλλαγή σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων, η σύγχρονη παρουσία συνεργατικών μεταλλάξεων και σχετιζόμενων παράλληλων μονοπατιών μεταβίβασης σήματος είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την παθογένεση της νόσου.

Τέτοια σχετιζόμενα μονοπάτια συμπεριλαμβάνουν την p53, μεταλλάξεις της οποίας σχετίζονται με κακή πρόγνωση, τις INK4A, IGF-1/IGF-1R, bFGF, p30/32^{MIC2} (CD99) καθώς και μία λίστα μορίων με δράση τυροσινικής κινάσης όπως και Wnt μονοπατιών μεταβίβασης σήματος^{42,119,153,154}. Ειδικότερα, αν και το IGF-1/IGF-1R μονοπάτι μεταβίβασης σήματος θεωρείται ως παράλληλο και ανεξάρτητο του EWSR1-FLI1, φαίνεται ότι η EWSR1-FLI1 ρυθμίζει την έκφραση του IGF-1.

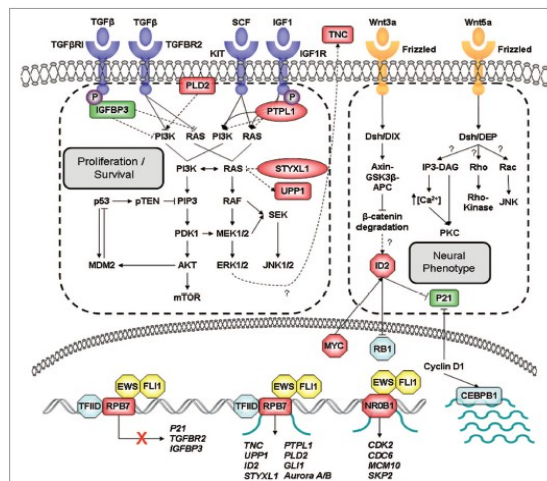


Εικόνα 8. Συμμετοχή της IGF-1/IGF-1R οδού μεταβίβασης σήματος στο σάρκωμα Ewing

Τα ενδοκυττάρια και διακυττάρια μονοπάτια μεταβίβασης σήματος τα οποία μεταβάλλονται στο σάρκωμα Ewing και ειδικότερα οι ακριβείς αλλαγές σε συγκεκριμένα μόρια που μετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια όπως μόρια προσκόλλησης κυτταρικής επιφανείας, κυτταροπλασματικοί υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης, αυξητικοί παράγοντες και μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν πολύτιμο υλικό μελέτης για σχεδιασμό και ανάπτυξη διαγνωστικών και θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Οι οδοί μεταβίβασης σήματος με την πλέον ουσιαστική συμμετοχή στο σάρκωμα Ewing είναι αυτοί των κινάσων τυροσίνης και του Wnt/Frizzled. Η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η διατήρηση του σαρκόματος Ewing καθορίζονται από την αυτοκρινή και παρακρινή διέγερση μεμβρανικών υποδοχέων αυξητικών παραγόντων από τους αντίστοιχους συνδέτες τους όπως για παράδειγμα IGF1/IGF1R, SCF/KIT και TGFβ/TGFβR.

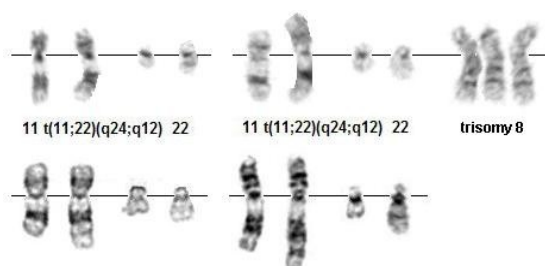
Όσον αφορά τις ενδοκυττάρια οδούς μεταβίβασης σήματος που ενεργοποιούνται από τον IGF1/IGF1R τόσο το μονοπάτι των Mitogen Activated Protein kinase όσο και το μονοπάτι της Phosphatidyl Inositol-3-Kinase συνεισφέρουν ισότιμα στις δράσεις που πυροδοτούνται από τον IGF1. Από την άλλη μεριά η σύνδεση του Frizzled με την Wnt γλυκοπρωτεΐνη προκαλεί συσώρευση της β-catenin και επακόλουθη αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων αυτής. Τελικό αποτέλεσμα της αυτοκρινούς και παρακρινούς δράσης της Wnt γλυκοπρωτεΐνης είναι η αύξηση της ιστικής διεύθυνσης και του μεταστατικού δυναμικού του νεοπλασματικού ES κυττάρου^{142,155-165}.



Εικόνα 9. Επίδραση της EWS/FLI1 χίμαιρας στην ρύθμιση της έκφρασης των άμεσων στόχων αυτής στα πλέον σημαντικά μονοπάτια μεταβίβασης σήματος που ενέχονται στο σάρκωμα Ewing. Καταδεικνύονται σε διακριτούς τομείς οι οδοί μεταβίβασης σήματος που ενέχονται από τη μια μεριά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό/κυτταρική επιθίωση και από την άλλη μεριά στην επιλογή και διαφοροποίηση προς νευρωνικό φαινότυπο. Οι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι της EWS/FLI1 χίμαιρας περιγράφονται σχηματικά (κινάσες ως εξάγωνα, φωσφατάσες ως οβάλ, μεταγραφικοί παράγοντες ως οκτάγωνα και οι λοιποί στόχοι ως ορθογώνια).

Αν και η EWS-ETS υβριδική πρωτεΐνη έχει τεκμηριωθεί ως το εναρκτήριο "πρωτεύον" μοριακό σύμβαμα της νόσου, έχουν ανιχνευθεί και πλήθος άλλα μοριακά και κυτταρογενετικά συμβάματα τα οποία στο σύνολό τους κατηγοριοποιούνται ως "δευτερεύοντα" μοριακά συμβάματα. Η σημασία και η συνεισφορά αυτών των "δευτερεύοντων" μοριακών συμβαμάτων στην παθογένεια του σαρκόματος Ewing δεν έχει επί του παρόντος αποσαφηνιστεί. Τέτοια δευτερεύοντα μοριακά συμβάματα είναι μεταλλάξεις σε γονίδια όπως p53, MDM2 και RAS οι οποίες αν και παρατηρούνται σε αυξημένη συχνότητα στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου, στο σάρκωμα Ewing ανιχνεύονται σπάνια. Εξαιρεση αποτελεί η σημειακή απάλειψη στον γενετικό τόπο CDKN2A locus η οποία παρατηρείται σε ποσοστό 15%-30% στο σάρκωμα Ewing. Η μετάλλαξη/απώλεια του CDKN2A γονιδιακού τόπου (locus) οδηγεί σε μετάλλαξη/απώλεια της p16^{INK4} και της p14^{ARF} με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της κυκλίνης D1 από την ανασταλτική δράση των p16^{INK4} και p14^{ARF}. Η απελευθερωμένη κυκλίνη D1, η οποία αποτελεί παράλληλα και έμμεσο

κατωφερή downstream στόχο μεταγραφικής υπερέκφρασης από την EWSR1-FLI1, δίδει πλέον το έναυσμα για την έναρξη του κυτταρικού κύκλου και την απρόσκοπτη πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανεξάρτητα και ανεξέλεγκτα από ανασταλτικά εξωκυττάρια μηνύματα και αρνητικούς ενδοκυττάριους μηχανισμούς ελέγχου της κυτταροδιαίρεσης¹⁶⁶⁻¹⁷⁶. Είναι αξιοσημείωτο ότι στο 80% των περιπτώσεων σαρκώματος Ewing ανιχνεύονται επιπρόσθετες κυτταρογενετικές ανωμαλίες της μορφής των αλλαγών του αριθμού των αντιγράφων (copy number alterations, CNA). Η πλέον συχνή είναι η τρισωμία 8 η οποία ανιχνεύεται στο 50% - 60% των περιπτώσεων, οι τρισωμίες 2, 5, 7, 9, 12 μεταξύ 10% και 15% των περιπτώσεων καθώς και η τρισωμία 1q διαμέσου μη-ισορροπημένης διαμετάθεσης t(1q;16q) στο 25% των περιπτώσεων. Πέρα από τις καρυοτυπικά ανιχνεύσιμες χρωμοσωμικές εκτροπές που αφορούν ευμεγέθη χρωμοσωμικά τμήματα, έχουν ανιχνευθεί και αλλαγές του αριθμού των αντιγράφων σε ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα μεγέθους μικρότερου των 100 Kbs. Η επίδραση της παρουσίας αυτών των copy number alterations CNA στο μεταγράφημα (transcriptome) έχει μελετηθεί καθορίζοντας ως ουδό (cut-off point) τις 3 CNA και καταδεικνύοντας, στις περιπτώσεις σαρκώματος Ewing που εμφανίζουν γενωμική αστάθεια με 4 ή περισσότερες CNA, υπερέκφραση γονιδίων που ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στη μίτωση και στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων¹⁷⁷⁻¹⁸⁶.



Εικόνα 10. Καρυότυπος κυττάρου σαρκώματος Ewing με επιπρόσθετη τρισωμία 8

Επιπλέον της ενδοκυττάριας παθογένειας, το νεοπλασματικό κύτταρο του σαρκώματος Ewing εμφανίζει και πλήθος αλληλεπιδράσεων με τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος στρώματος του όγκου. Το μικροπεριβάλλον του όγκου επηρεάζει, μέσω εξωκυττάρων και διακυττάρων

παρακρινών δράσεων σε υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης του ES κυττάρου, μονοπάτια μεταβίβασης σήματος που καθορίζουν τόσο τον πολλαπλασιασμό του νεοπλασματικού κυττάρου, όσο και την ικανότητά του για διακυττάρια διασπορά, ιστική διείσδυση και αγγειογένεση. Οι σημαντικότερες εξ' αυτών επιδράσεις στην ανάπτυξη, εδραίωση και εξέλιξη του σαρκώματος Ewing αφορούν στην ικανότητά του νεοπλασματικού κυττάρου να διαφεύγει της επιτήρησης από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και να επάγει τη νέο-αγγειογένεση. Τα κύτταρα του σαρκώματος Ewing εμφανίζουν χαμηλή ή μηδαμινή έκφραση των αντιγόνων κυτταρικής επιφανείας HLA τύπου I και II με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά κύτταρα του ανοσοποιητικού.

Επιπλέον τα κύτταρα του σαρκώματος Ewing αποφεύγουν την απόπτωση μέσω της έκφρασης ειδικών αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (serine protease inhibitor-9 και cellular FLICE-inhibitory protein) ενώ παράλληλα εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην κυτταρόλυση και την απόπτωση την επαγόμενη από το death-receptor Fas-FasL pathway πιθανότατα μέσω αδρανοποίησης της initiator caspase-8. Από την άλλη μεριά ωστόσο είναι επιρρεπή τόσο στην απόπτωση που επάγεται από το perforin-granzyme pathway, όσο και στην κυτταρόλυση την επαγόμενη από IL-15 activated NKG2-D/DNAM-1 Natural Killer κύτταρα¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Επιπλέον έχει καταδειχτεί ότι τα ES κύτταρα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα VEGF165, Delta-like ligand 4 και MEKK3 kinase. Έχει τεκμηριωθεί η παρακρινή δράση του VEGF165 επί του VEGFR2 μεμβρανικού υποδοχέα των κυττάρων του μυελού των οστών ως το καταλυτικό εναρκτήριο ερέθισμα για τη νέο-αγγειογένεση. Η παράλληλη παρουσία στο μικροπεριβάλλον του όγκου Delta-like ligand 4 επάγει τη στρατολόγηση πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών και την επακόλουθη διαφοροποίηση των σε περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού χιτώνα και ενώ η παρουσία της MEKK3 kinase είναι απαραίτητη για τη νέο-αγγειογένεση. Επιπροσθέτως, η παρακρινής δράση του παραγόμενου από τα νεοπλασματικά κύτταρα VEGF165 επί του VEGFR2 μεμβρανικού υποδοχέα των κυττάρων του μυελού των οστών επάγει,

μέσω τροποποίησης της έκφρασης του ενεργοποιητικού υποδοχέα NFκB, την πρόκληση οστεόλυσης προσδίδοντας έτσι επιπρόσθετο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό¹⁹¹⁻¹⁹⁷. Είναι λοιπόν προφανές, από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, ότι στο σάρκωμα Ewing το διακυττάριο παθογενετικό δίκτυο το ίδιο αν όχι περισσότερο πολύπλοκο από το ενδοκυττάριο παθογενετικό δίκτυο της νόσου.

Από τα προαναφερθέντα τεκμηριώνεται ότι στην αδιευκρίνιστη μέχρι σήμερα πολυπλοκότητα της παθογένειας της νόσου συμμετέχουν ισότιμα τόσο οι ενδοκυττάρια όσο και οι διακυττάρια – ιστικές οδοί μεταβίβασης σήματος.

Μέσα από την εισαγωγή καθίσταται προφανής αφ' ενός μεν η μέγιστη σημασία της έγκαιρης και ακριβούς κυτταρομοριακής διαφοροδιαγνωστικής, ανάμεσα στα υπόλοιπα νεοπλάσματα της ομάδας των small round blue cell tumors, αφ' ετέρου δε η πολυπλοκότητα της νόσου τόσο σε ενδοκυττάριο όσο και σε διακυττάριο / ιστικό επίπεδο. Η δυσοίωση πρόγνωση που συνοδεύει το σάρκωμα Ewing με τη θνητότητα να ξεπερνά το 90% και η μεγάλη νοσηρότητα των εφαρμοζόμενων θεραπειών (ακρωτηριαστική χειρουργική αντιμετώπιση και χήμειο-άκτινο-θεραπεία) καθιστά επιτακτική την ανάγκη για τη διαλεύκανση της παθογένειας της νόσου με απώτερο στόχο την αναζήτηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Στην εργασία που ακολουθεί περιγράφεται η κυτταρομοριακή διαφοροδιαγνωστική της νόσου, σε μία ασθενή 15 ετών η οποία εμφανίζει νεόπλασμα η παθολογοανατομική εικόνα του οποίου το κατατάσσει στην ομάδα των small round blue cell tumors.

Η κυτταρομοριακή διάγνωση τεκμηριώνεται με εφαρμογή ερευνητικής μεθοδολογίας των βασικών ιατρικών επιστημών. Στη συζήτηση που ακολουθεί γίνεται μία επιγραμματική απόπειρα περιληπτικής περιγραφής και αιτιολόγησης των στοιχειωδών βασικών ερευνητικών βημάτων που θα πρέπει ιδεατά να εφαρμόζονται προκειμένου να οδηγηθούμε τόσο στην αποσαφήνιση της αιτιοπαθογένειας και των μηχανισμών διασποράς της νόσου, όσο και στην ανάδειξη παραγόντων προγνωστικών της υποτροπής και προβλεπτικών της ανταπόκρισης στη

θεραπεία, με απώτερο σκοπό το σχεδιασμό αποτελεσματικότερων και ελπιδοφόρων θεραπευτικών στρατηγικών.

Υλικά

Ως υλικό για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν: α) κύβος μονιμοποιημένου σε παραφίνη νεοπλασματικού ιστού καθώς και β) φρέσκος νεοπλασματικός ιστός από βαθιά ψύξη. Ο εν λόγω νεοπλασματικός ιστός αφορούσε γυναίκα ασθενή ηλικίας 15 ετών η οποία υπεβλήθη σε χειρουργική επέμβαση αφαίρεσης μορφώματος μαλακών μορίων από την πρόσθια επιφάνεια δεξιού μηρού.

Η παθολογοανατομική εξέταση τεκμηρίωσε τη διάγνωση κακοήθους νεοπλάσματος μεσεγχυματογενούς αρχής από μικρά στρογγύλα μπλέ κύτταρα. Περαιτέρω ταυτοποίηση του νεοπλάσματος με βάση την κυτταρική μορφολογία και την ανοσοϊστοχημεία δεν κατέστη δυνατή.

A) Μοριακές Τεχνικές προς ανίχνευση της συγκεκριμένης διαμετάθεσης

Οι μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν προς ανίχνευση της συγκεκριμένης διαμετάθεσης είναι ο φθορίζων in-situ υβριδισμός και η ποσοτική πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφάσης αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Μέθοδοι-Αποτελέσματα

1. Μέθοδος φθορίζοντος in-situ υβριδισμού FISH (Fluorescent in-situ hybridization)

Η αρχική προσέγγιση έλαβε χώρα με την ερευνητική μεθοδολογία του φθορίζοντος in-situ υβριδισμού FISH (Fluorescent in-situ Hybridization)¹⁹⁸⁻²⁰⁵.

Από τον κύβο παραφίνης κόπηκαν σε μικροτόμο (SLEE CUT 6062 fully automatic Rotatory Microtome) 10 τομές έκαστη πάχους 5μm και επιστρώθηκαν επί θετικά φορτισμένων πλακιδίων (positive charged slides). Αποξήρανση για 12 ώρες (Dry Overnight) σε θερμοκρασία 37°C. Ακολούθησε αποπαραφίνωση με εμβάπτιση επί 3 φορές και για διάστημα 5 min κάθε φορά σε Ξυλένη ή εναλλακτικά με εμβάπτιση επί 2 φορές και για διάστημα 10 min κάθε φορά σε Critisoln, ακολουθούμενη από εμβάπτιση επί 3 φορές και για διάστημα 3 min κάθε φορά σε ισοπροπανόλη. Επανυδάτωση μέσω βαθμιδωτών διαλυμάτων 95%, 80%, 69% και 30% αιθυλικής αλκοόλης σε απιονισμένο ύδωρ. Πλύσεις σε τρεχούμενο ύδωρ για 5 min

και στη συνέχεια σε απιονισμένο ύδωρ για 3 min. Ανάκληση Αντιγόνων (antigen retrieval) με εμβάπτιση των πλακιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος pH 6.0 εντός πλαστικού δοχείου τύπου Corlin, απότομη θέρμανση με θερμούς υδρατμούς και βραδεία προοδευτική ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Πλύσεις σε τρεχούμενο ύδωρ για 5 min και στη συνέχεια σε απιονισμένο ύδωρ για 3 min. Επώαση στους 80°C σε διάλυμα θειοκυανιούχου νατρίου (16 gr θειοκυανιούχου νατρίου σε 200 ml απιονισμένου ύδατος) για 10 min. Πλύσεις σε PBS (Phosphate Buffered Saline) μονής 1X και διπλής 2X συγκέντρωσης. Επώαση σε διάλυμα πεψίνης 0.4% [P-7012, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA] (0.8 gr πεψίνης σε 200 ml 0.1 M HCl, παρασκευή του διαλύματος αμέσως πριν την χρήση) για 10-15 min στους 37°C. Εξουδετέρωση - Καταστολή της πεψίνης σε διάλυμα γλυκίνης (0.4 gr γλυκίνης σε 2X PBS). Πλύσεις σε PBS (Phosphate Buffered Saline) μονής 1X και διπλής 2X συγκέντρωσης.

Μετα-Καθήλωση (post-fix) σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (8gr παραφορμαλδεΐδης σε 200 ml PBS στους 80°C, ψύχουμε σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση, παρασκευή του διαλύματος την ημέρα της χρήσης) για 2 min. Καλές πλύσεις σε PBS: 3 αλλαγές σε διάστημα 15 min. Πλύσεις σε διάλυμα 2X SSC Standard Saline Citrate Stock Solution για 5min εντός περιστρεφόμενου δοχείου.

Αφυδάτωση μέσω βαθμιδωτών διαλυμάτων 30%, 69%, 80% και 95% αιθυλικής αλκοόλης σε απιονισμένο ύδωρ και στη συνέχεια αποξήρανση σε θερμό ρεύμα αέρα. Επιλογή των προ-ετοιμασθέντων και προ-παρασκευασθέντων σε μορφή διαλύματος φθορίζοντων ιχνηθετών χρωμοσωμάτων (Chromosome Paint) από τη βαθιά ψύξη (-80°C).

Εφαρμόσθηκαν 2 διαφορετικές στρατηγικές προσέγγισης της FISH μεθοδολογίας:

α) FISH break apart strategy όπου χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο EWSR1 dual color break apart set [Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA]. Το εν λόγω kit συνδυάζει δύο DNA ιχνηθέτες, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί έτσι να είναι συμπληρωματικοί και να υβριδοποιούν το DNA εκατέρωθεν της περιοχής διάσπασης EWSR1 breakpoint region μεγέθους 7 kb η

οποία εδράζεται μεταξύ των εξονίων 7 και 10 του γονιδίου EWS.

Ο πρώτος εκ των ιχνηθετών έχει μήκος 500 kb, είναι σχεδιασμένος για να υβριδοποιεί συμπληρωματικά την DNA αλληλουχία η οποία εκτείνεται κεντρομερικά της περιοχής διάσπασης EWSR1 breakpoint region και με κατεύθυνση προς το 3' άκρο του DNA, με το φάσμα φθορισμού του να είναι ορατό σε χρώμα πορτοκαλί.

Ο δεύτερος εκ των ιχνηθετών έχει μήκος 1100 kb, είναι σχεδιασμένος για να υβριδοποιεί συμπληρωματικά την DNA αλληλουχία η οποία εκτείνεται τελομερικά της περιοχής διάσπασης EWSR1 breakpoint region και με κατεύθυνση προς το 5' άκρο του DNA, με το φάσμα φθορισμού του να είναι ορατό σε χρώμα πράσινο.

[<http://www.vysis.com>]

β) FISH fusion approach strategy όπου χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο DNA ιχνηθέτες.

Ο πρώτος εκ των ιχνηθετών, μήκους 180 kb, σημασμένος με ροδαμίνη είναι συμπληρωματικός και υβριδοποιεί το DNA του γονιδίου EWS (22q12.2).

EWSR1 22q12.2 FISH probe Empire Genomics
Ο δεύτερος εκ των ιχνηθετών, μήκους 170 kb σημασμένος με φθοριο-ισο-θειοκυανικό είναι συμπληρωματικός και υβριδοποιεί το DNA του γονιδίου FLI-1 (11q24).

CHEK1 11q24 FISH probe Empire Genomics [<http://www.empiregenomics.com>].

Κάθε ιχνηθέτης ευρίσκεται εντός προπαρασκευασμένου διαλύματος από ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού tDenHyb™ hybridization buffer [Insitus Biotechnologies, Albuquerque, NM, USA] σε συγκέντρωση εργασίας 1:25

Απόψυξη, ανάδευση των διαλυμάτων ιχνηθετών και ανάμειξη μεταξύ τους ώστε να προκύψει διάλυμα μίγματος ιχνηθετών και θέρμανση αυτού στους 37°C. Επίθεση 10-15 μl μίγματος ιχνηθετών στο κέντρο του πλακιδίου. Επικάλυψη με καλυπτρίδα υάλου (22X40mm) και επικόλληση, ενσφράγιση και στεγανοποίηση με επίστρωση Fixogum Rubber Cement. Αποδιάταξη (CoDenaturation) των σφραγισθέντων πλακιδίων με τοποθέτηση αυτών για 13 min επί σκιερής - προστατευόμενης από το φως - μεταλλικής επιφανείας τάφρου για πλακίδια [Boeckel scientific slide moat model 240000] προθερμανθείσας στους 80-90°C. Τοποθέ-

τηση των πλακιδίων σε οριζόντια θέση σε υγρή θερμοκοιτίδα και υβριδοποίηση ολονυκτίς στους 37°C. Προσεκτική αποφλοιώση την στρώση Fixogum Rubber Cement και απομάκρυνση της υάλινης καλυπτρίδας. Πλύσεις σε διάλυμα φορμαμίδης για πλύσεις (50 ml απιονισμένης φορμαμίδης σε 50 ml 2X SSC Standard Saline Citrate Stock Solution) στους 37°C για 3 αλλαγές έκαστη αλλαγή διάρκειας 5 min. Πλύσεις σε διάλυμα Stringency για πλύσεις (2X SSC Standard Saline Citrate Stock Solution) στους 37°C για 3 αλλαγές σε συνολικό χρονικό διάστημα διάρκειας 15 min. Πλύσεις σε διάλυμα Detergent για πλύσεις (0.1 ml 10% Tween 20 σε 200 ml 4X SSC Standard Saline Citrate Stock Solution) στους 37°C για 10 min. Πλύσεις σε PBS (Phosphate Buffered Saline), για 3 αλλαγές σε συνολικό χρονικό διάστημα διάρκειας 15 min. Αποξήρανση σε αέρα.

Ενστάλλαξη επί έκαστου των πλακιδίων 10 ml αντιδραστηρίου 4',6 - Diamidino-2-phenylindole reagent MD (DAPI & Mountant) Fluorgard [Insitus]. Τοποθέτηση καλυπτρίδος. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX60 [Olympus Melville, NY, USA] με κατάλληλα φίλτρα φθορισμού και αρίθμηση των πράσινων και κόκκινων σημάτων φθορισμού σε νεοπλασματικά κύτταρα. Για να τεκμηριωθεί ο υβριδισμός το ελάχιστο προαπαιτούμενο νούμερο ήταν η εκτίμηση 100 και πλέον μη-αλληλοεπικαλυπτόμενων πυρήνων για την ανίχνευση συντηχθέντων (fused) η/και διαχωρισθέντων (split) πράσινων και κόκκινων σημάτων.

Όσον αφορά τη στρατηγική της FISH fusion approach το θετικό αποτέλεσμα ερμηνεύτηκε ως η παρουσία fused signals [κίτρινα σήματα ή ζεύγη κόκκινων-πράσινων σημάτων με μέγιστη αποδεκτή απόσταση διαχωρισμού μεταξύ κόκκινου και πράσινου σήματος έκαστου ζεύγους μικρότερη από τη διάμετρο 1 σήματος] σε ποσοστό τουλάχιστον 30% του συνόλου των εξετασθέντων πυρήνων.

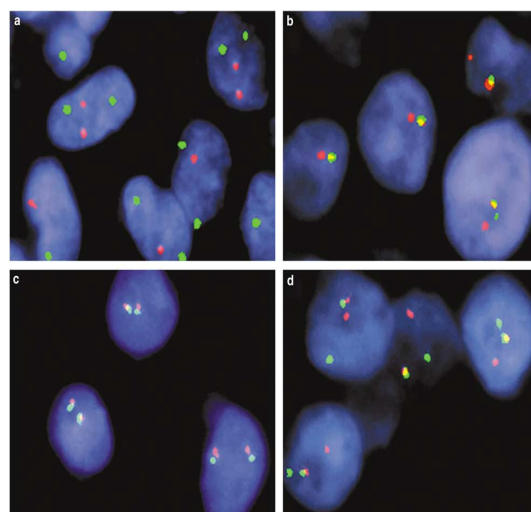
Όσον αφορά τη στρατηγική της FISH break apart approach το θετικό αποτέλεσμα ερμηνεύτηκε ως η παρουσία split signals [ζεύγη κόκκινων-πράσινων σημάτων με ελάχιστη αποδεκτή απόσταση διαχωρισμού μεταξύ κόκκινου και πράσινου σήματος έκαστου ζεύγους μεγαλύτερη από τη διάμετρο 1 σήματος] σε ποσοστό τουλάχιστον 15% του συνόλου των εξετασθέντων πυρήνων. Τα ποσοστά ουδός 30% και 15%

οριοθετήθηκαν με βάση μετρήσεις σε μη-νεοπλασματικό ιστό ως μάρτυρα control και μετά από υπολογισμό της μέσης τιμής + / - 3 σταθερές απόκλισης (mean+/-3 s.d.). Οι εικόνες της τεχνικής FISH αποτυπώθηκαν με ασπρόμαυρη, υψηλής ανάλυσης, COHU charge coupled device [CCD] camera, Z-stack motor and Cytovision™ basic workstation [Applied Imaging, Santa Clara, CA, USA] με εξακολουθητικά εν σειρά φίλτρα DAPI ενός επιπέδου, FITC 10 επιπέδων και ροδαμίνης 10 επιπέδων. Οι ληφθείσες εικόνες υπεβλήθησαν σε ανασύσταση με κυανό, πράσινο και ερυθρό ψευδή χρωματισμό χρησιμοποιώντας το λογισμικό Cytovision™.

Αποτελέσματα για FISH approach

Τεκμηριώθηκε η παρουσία της διαμετάθεσης t(11;22)(q24;q12) και της EWSR/FLI-1 σύντηξης στους πυρήνες των νεοπλασματικών κυττάρων της ασθενούς.

Ως αρνητικά control χρησιμοποιήθηκαν νεοπλασματικοί ιστοί από αδιαφοροποίητο καρκίνωμα από μικρά στρογγύλα κύτταρα καθώς και από μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα προερχόμενα από υλικό του αρχείου του εργαστηρίου



Εικόνα 11. a. FISH-Fused approach αρνητική περίπτωση με split signals EWS (κόκκινα) και FLI-1 (πράσινα) από γνωστό αρνητικό control προερχόμενο από αδιαφοροποίητο καρκίνωμα από μικρά στρογγύλα κύτταρα. b. FISH-Fused approach θετική περίπτωση για EWS/PNET με fused signals από την ασθενή. c. FISH-BA approach αρνητική περίπτωση με φυσιολογικά fused signals EWS (κεντρομερικά χρώματος κόκκινου και τελομερικά χρώματος πράσινου), από γνωστό αρνητικό control προερχόμενο από μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. d. FISH-BA approach θετική περίπτωση για EWS/PNET από την ασθενή με split signals στην πλειοψηφία των πυρήνων.

2. Μέθοδος Ποσοτικής Πραγματικού Χρόνου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης μετά από Ενζυμική Προσέγγιση Αντίστροφης Μεταγραφάσης – Quantitative Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Q-real time RT-PCR)

Η τεχνική της Q-real time RT-PCR εφαρμόζεται προκειμένου να τεκμηριωθεί η παρουσία ή η απουσία του υβριδικού μεταγραφήματος σύντηξης (EWS-FLI1 fusion transcript) και να ακολουθήσει στην περίπτωση της παρουσίας του η ακριβής ποσοτικοποίησή του.

Η ερευνητική μέθοδος της Quantitative real time RT-PCR μεθοδολογίας εφαρμόστηκε τόσο σε φρέσκο νεοπλασματικό ιστό, όσο και σε μονιμοποιημένο με φορμαλίνη και εμβυθισμένο σε παραφίνη νεοπλασματικό ιστό²⁰⁶⁻²¹⁰.

α) Σε φρέσκο κατεψυγμένο νεοπλασματικό ιστό

Ο φρέσκος ιστός είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητος για την εφαρμογή της RT-PCR και την ανίχνευση του fusion transcript συγκριτικά με τον ιστό τον μονιμοποιημένο με εμβύθιση σε παραφίνη. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της RT-PCR γίνεται με γνωστό θετικό μάρτυρα. Ο θετικός μάρτυρας είναι είτε γνωστός θετικός ιστός ελέγχου (positive control tissue), είτε κεκαθαμένο RNA (purified RNA) προερχόμενο από γνωστό θετικό ιστό ελέγχου. Το c-DNA παράγωγο της RT-PCR θα υποβληθεί σε ανάλυση αλληλουχίας (DNA sequencing) η οποία με τη σειρά της θα επιβεβαιώσει την παρουσία του fusion transcript.

Εξαγωγή και Απομόνωση του RNA (RNA extraction and isolation):

Σε μια πρώτη φάση έλαβε χώρα ομογενοποίηση των ιστικών δειγμάτων σε 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL [InvitroGen] ανά 50 mgr -100 mgr ιστικού δείγματος, χρησιμοποιώντας ομογενοποιητή ισχύος ή ομογενοποιητή υάλου-Τεφλόν [Polytron, Tekmar's TISSUEMIZER]. Ο συνολικός όγκος του δείγματος δεν υπερβαίνει το 10% του όγκου του αντιδραστηρίου TRIZOL που απαιτήθηκε για την ομογενοποίηση.

Ακολούθησε κυτταροκαλλιέργεια σε μονοκύτταρη στοιβάδα κυττάρων. Έκπλυση της μονής στοιβάδας κυττάρων με PBS (Pooled Blood Serum), τοποθετημένο εντός δοχείου περιβαλλόμενου από πάγο, για 1 φορά. Διάλυση των κυττάρων άμεσα σε τριβλίο καλλιέργειας με προσθήκη 1 ml

αντιδραστηρίου TRIZOL [InvitroGen] ανά 3,5 εκατοστά διάμετρο τριβλίου ή ανά 10 τετραγωνικά εκατοστά επιφανείας τριβλίου, προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του απομονωθέντος RNA με DNA και απόξεση των κυττάρων με ξύστη [Cell Scraper]. Διέλευση του κυττατούματος (προϊόντος της κυτταρολύσεως) δια μέσου μικροπιπέτας για 10 τουλάχιστον επαναλήψεις. Ανάδευση σε Vortex για 15 sec. Ακολούθησε κυτταροκαλλιέργεια σε εναιώρημα. Φυγοκέντρηση κυττάρων για 5 min στα 300 X g. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο μέσο και επαναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα σε PBS (Pooled Blood Serum), τοποθετημένο εντός δοχείου περιβαλλόμενου από πάγο, για 1 φορά. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 min στα 300 X g και λήψη υποκείμενου ιζήματος αποτελούμενου από κυτταρικούς σφαιρικούς σωρούς – συσσωματώματα κυτταρικά. Προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL [InvitroGen] ανά 5-10 x 10⁶ ζωικά κύτταρα στους κυτταρικούς σφαιρικούς σωρούς (pellet cells). Ολοκλήρωση της λύσης των κυττάρων με διέλευση του κυτταρούματος (προϊόντος της κυτταρολύσεως) δια μέσου μικροπιπέτας για 10 τουλάχιστον επαναλήψεις ή διαμέσου σύριγγας με λεπτή βελόνη. Επώαση του ομογενοποιημένου κυτταρούματος (είτε από μονοκύτταρη στοιβάδα κυττάρων είτε από κυτταρικό εναιώρημα) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να ολοκληρωθεί πλήρως η αποδιάταξη του συμπλέγματος των νουκλεοπρωτεϊνών. Φυγοκέντρηση για να καθιζάνουν τα υπολείματα κυτταρικών οργανιδίων (cell debris). Μεταφορά του υπερκείμενου σε νεό δοκιμαστικό σωλήνα. Μετά την ομογενοποίηση ακολούθησε η φάση διαχωρισμού. Προσθήκη στο υπερκείμενο που ελήφθη από το τη φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου κυτταρούματος 0.2 ml χλωροφορμίου για κάθε 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL που χρησιμοποιήθηκε για την κυτταρόλυση. Ασφαλής επιπωματισμός των δοκιμαστικών σωλήνων. Ανάδευση σε Vortex για 15 sec και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 – 3 min. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 12000 x g για 15 min σε θερμοκρασία 2 – 8 °C. Μετά την φυγοκέντρηση παραλαμβάνουμε 3 φάσεις: Μία υπερκείμενη διαυγή υδατική φάση εντός της οποίας περιέχεται αποκλειστικά το RNA,

μία υποκείμενη ερυθρά φάση φαινόλης-χλωροφορμίου και μία ενδιάμεση διάφαση. Προσεκτική λήψη και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης, χωρίς διαταραχή της διάφασης, εντός νέου δοκιμαστικού σωλήνα. Υπολογισμός του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης (ο συνολικός όγκος της υδατικής φάσης θα πρέπει να είναι το 60% του συνολικού όγκου του αντιδραστήριου TRIZOL που χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση). Στη συνέχεια ακολούθησε η φάση ιζηματοποίησης / καθίζησης του RNA από την διαυγή υδατική φάση με ανάμειξη με ισοπροπυλική αλκοόλη (0.5 ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1 ml αντιδραστήριου TRIZOL που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση). Επώαση του δείγματος για 10 min στους 15 – 30 °C.

Φυγοκέντρηση του δείγματος σε 12000 x g για 10 min σε θερμοκρασία 2 – 4 °C. Το ίζημα του RNA συχνά αόρατο πρίν την φυγοκέντρηση, δημιουργεί μετά τη φυγοκέντρηση σφαιρίδια ιζήματος γέλης στον πυθμένα και στα πλάγια τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα.

Στη συνέχεια ακολούθησε η φάση πλύσης του RNA. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου. Πλύση των σφαιριδίων ιζήματος γέλης του RNA για 1 φορά με 75% αιθανόλη (1 ml 75% αιθανόλης για κάθε 1 ml αντιδραστήριου TRIZOL που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση). Ανάδευση σε Vortex για 15 sec. Φυγοκέντρηση του δείγματος σε 7500 x g για 5 min σε θερμοκρασία 2 – 8 °C.

Επανάληψη της όλης διαδικασίας πλύσης για 1 επιπλέον φορά και απομάκρυνση της αιθανόλης που απέμεινε. Φάση μερικής επαναδιάλυσης του RNA. Μερικού βαθμού αποξήρανση των σφαιριδίων γέλης RNA είτε σε κενό είτε σε ρεύμα αέρος για 5 – 10 min. Δείγματα μερικώς επαναδιαλυόμενου RNA εμφανίζουν λόγο A_{260} / A_{280} μικρότερο του 1.6. Διαλυτοποίηση του RNA σε ύδωρ επεξεργασμένο με DEPC [Ambion] με επαναληπτικές διελεύσεις μέσω πιπέτας.

Ανάλυση Φασματοφωτομετρίας.

Διάλυση 1 μl RNA σε 39μl DEPC-treated water [1:40 διάλυση]. Χρησιμοποιώντας μικροκυψελίδα χωρητικότητας 10 μl προχωράμε σε μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 260 nm και στα 280 nm προκειμένου να καθορίσουμε τη συγκέντρωση και την

καθαρότητα του δείγματος. Ο λόγος A_{260} / A_{280} πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 1.6 με τη συμβατική αποδοχή ότι 1 OD στα 260 nm ισοδυναμεί με 40 mgr/ml RNA.

Αντίστροφη Μεταγραφή: Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT reaction) επετεύχθη με το SuperScript First-Strand Synthesis System for PCR με βάση το Invitrogen's protocol. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω controls: Control ύδατος χωρίς RNA, RT αντίδραση χωρίς RNA, RT αντίδραση χωρίς RT, RT αντίδραση με RNA μη επεξεργασμένο με DNAase. Επεξεργασία του RNA με DNAase: Βάση πρωτοκόλλου για την Gibco DNAase I, Amplification grade. Τα περισσότερα αντιδραστήρια είναι εφοδιασμένα με το ένζυμο (εκτός από λίγο dT και dNTPs). Χρησιμοποιήθηκαν 2 μg ολικού RNA. Η συγκέντρωση καθορίζεται με βάση την οπτική πυκνότητα OD_{260} .

1. Έναρξη αντίδρασης ως εξής: 1.5 μl 10x DNAase I reaction buffer, 1.5 μl DNAase (1u / μl) RNA και ύδωρ επεξεργασμένο με DEPC έως 12 μl. Επώαση των δειγμάτων για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. 2. Απενεργοποίηση της DNAase με προσθήκη 1.5 μl EDTA 25mM. Θέρμανση για 10 min στους 65°C. 3. Ηλεκτροφόρηση 3 μl σε γέλη προκειμένου να ελεγχθεί η ακεραιότητα του RNA και η απουσία DNA.

Σύνθεση της πρώτης έλικας cDNA: Επαναποσοτικοποίηση του, επεξεργασμένου με DNAase, RNA μέσω μέτρησης OD_{260} . Χρησιμοποίηση ίσων ποσοτήτων RNA στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (συνήθως 1-2 μg). 1. Παρασκευή του μείγματος RNA/primer (εκκινητή) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα: ολικό RNA 5 μgr, 3 μl τυχαία εξαμερή (50 ngr/μl), 1 μl 10mM dNTP μείγμα, προσθήκη DEPC treated H₂O έως 10 μl συνολικού όγκου. Ανάμειξη του, επεξεργασμένου με DNAase, RNA με ύδωρ επεξεργασμένο με DEPC μέχρι τελικού όγκου 15 μl. Προσθήκη 0.5 μl εκκινητή 10μM. 2. Επώαση και θέρμανση του μείγματος των δειγμάτων στους 65°C-70°C για 5-10 min, επακόλουθη ταχεία ψύξη σε πάγο για τουλάχιστον 1 min και συλλογή των περιεχομένων του σωλήνα με βραχεία φυγοκέντρηση. 3. Προετοιμασία του κυρίου μείγματος της αντιδράσεως. Δημιουργία 50 μl διαλύματος αντιδραστήριου της αντίδρασης PCR ως εξής: 2 μl δείγματος RT αντίδρασης από το παραπάνω βήμα, 5 μl 10X PCR buffer,

4 μl 25mM MgCl₂, 1 μl 10mM dNTP's, 1 μl Primer 1 (10μM), 1 μl Primer 2 (10μM), 0.5 μl Taq DNA Πολυμεράση, 35.5 μl dH₂O. Για κάθε αντίδραση: 2 μl 10X RT-PCR buffer, 4 μl 25mM MgCl₂, 2 μl 0.1 M DTT, 1 μl RNAaseOUT. Δημιουργία μείγματος αντίστροφης μεταγραφάσης που να επαρκεί για 5 αντιδράσεις (4 controls και το δείγμα): 25 μl 5xRT buffer, 10 μl 0.1M DTT, 5 μl 10mM dNTP mix, 1.25 μl RNAsin, 5 μl Superscript II. Αναμειγνύουμε ελαφρά. Κατανομή 9.5 μl από το κάθε δείγμα RNA σε δοκιμαστικούς σωλήνες για PCR χωρητικότητας 0.2 ml. 4. Προσθήκη του κυρίου μείγματος της αντιδράσεως στο μείγμα RNA/primer (εκκινητή), γρήγορη ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min. Αυτό επιτυγχάνεται με προσθήκη 1 μl (50 units) SuperScript II RT σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ανάμειξη και επώαση στους 25°C για 10 min. 5. Αντίδραση PCR: Τοποθέτηση στην μηχανή PCR και κύκλοι: 18°C για 5 min, 42°C για 90 min, 50°C για 10 min, θερμική απενεργοποίηση στους 70°C για 10 min και στη συνέχεια ψύξη σε πάγο στους 4°C. Για control με απουσία RT, χρησιμοποιήθηκε δείγμα RT με ύδωρ αντί για ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης. Επανάληψη διαδικασίας με το control. 6. Προσθήκη 1 μl RNAase H και επώαση στους 37°C για 20 min. 7. Αποθήκευση της 1^{ης} αλύσου cDNA στους -20°C μέχρι την έναρξη της real-time PCR. Ποσοτική Real-time PCR: Στη φάση αυτή αναλύεται ποσοτικά η έκφραση των καινούριων γονιδίων.

Η έκφρασή τους στον ιστό τον προερχόμενο από το σάρκωμα EWING συγκρίνεται με τη σχετική (relative) έκφρασή τους σε μάρτυρα υγιή ιστό (control healthy tissue) καθώς και με τη σχετική (relative) έκφραση γονιδίων βασικών λειτουργιών (housekeeping genes)

1. Κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων των εκκινητών primers και ανάμειξη ειδικών για τα γονίδια gene-specific ζευγών εμπρόσθιων και αντίστροφων εκκινητών (forward και reverse). Η συγκέντρωση κάθε εκκινητή (εμπρόσθιου ή αντίστροφου) στο μείγμα είναι 5 pmol/μl. 2. Οργάνωση του πειράματος και του επακόλουθου PCR program σε ABI Prism SDS 7000. Τοποθέτηση στην μηχανή PCR και κύκλοι: (50°C για 2 min) X1, (95°C για 10 min) X1, (95°C για 15 sec, 60°C για 30 sec, 72°C για 30 sec) X40, (72°C για 10 min) X1.

3. Προετοιμασία 50 μl μείγματος για Real-time PCR: 25 μl SYBR Green Mix (2X), 0.5 μl liver cDNA, 2 μl μείγματος ζεύγους εκκινητών (5 pmol/μl κάθε εκκινητής), 22.5 μl H₂O. 4. Μετά την ολοκλήρωση της PCR απομάκρυνση των δοκιμαστικών σωλήνων από την μηχανή PCR. Η ειδικότητα της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση: 20-25 μl από το τελικό προϊόν της αντίδρασης PCR υπεβλήθη σε ηλεκτροφόρηση σε 1%-3% γέλη αγαρόζης και ακολούθως σε οπτικοποίηση, συνοδό καθήλωση και αποτύπωση για πιστοποίηση της ζώνης ηλεκτροφόρησης με υβριδοποίηση. Τα εναπομείναντα 25 μl της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να κλωνοποιηθεί και να προσδιοριστεί η αλληλουχία της υπό μελέτη ηλεκτροφορητικής ζώνης. 5. Επανατοποθέτηση των δειγμάτων στο SDS 7000 και πραγματοποίηση ανάλυσης της καμπύλης αποδιάταξης με το αποθηκευμένο αντίγραφο του αρχείου εκκίνησης, (put tubes back in SDS 7000 and perform dissociation curve analysis with the saved copy of the setup file). 6. Ανάλυση των αποτελεσμάτων της real-time PCR με το λογισμικό SDS 7000 software. Έλεγχος για την ύπαρξη αμφικόρυφης καμπύλης αποδιάταξης ή ανικανονικής καμπύλης ενίσχυσης (abnormal amplification plot).

β) Σε νεοπλασματικό ιστό μονιμοποιημένο σε κύβο παραφίνης Quantitative in-situ real time reverse transcriptase PCR

Απομόνωση RNA (RNA extraction):

Από τον κύβο παραφίνης κόπηκαν σε μικροτόμο (SLEE CUT 6062 fully automatic Rotatory Microtome) 4 τομές έκαστη πάχους 10μm και επιστρώθηκαν επί θετικά φορτισμένων πλακιδίων (positive charged slides). Οι θέσεις τομής βασίστηκαν σε μάρτυρα control χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης προκειμένου να επιλεγούν περιοχές αντιπροσωπευτικές με νεοπλασματικά κύτταρα. Ακολούθησε αποπαραφίνωση με πλύσεις ξυλένης και αιθανόλης και πέψη σε ρυθμιστικό διάλυμα [buffer Tris pH 7.5, 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid EDTA, 1% sodium dodecyl sulphate SDS] το οποίο να περιέχει 25 mgr πρωτεΐνάση K. Στη συνέχεια το ολικό RNA εξάχθηκε από τον ιστό χρησιμοποιώντας μία τροποποιημένη γουανίδινο-ισοθειοκυανική μέθοδο με το αντιδραστήριο TRIZOL [Gibco/BRL

Gaithersburg, MD, USA] και προετοιμασία με DNase I πριν την αντίστροφη μεταγραφή.

Αντίστροφη Μεταγραφή (RT-PCR):

Τα δείγματα RNA υπεβλήθησαν σε αντίστροφη μεταγραφή με την αντίστροφη μεταγραφάση τύπου Muln και το Gene Amp RNA-PCR kit [Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA] και εστιακά εντοπισμένη nested PCR διενεργήθη για το EWS-FLI1 χρησιμοποιώντας γνωστούς από τη βιβλιογραφία εκκινητές primers^{20,21}. Τα ενισχυθέντα από την PCR παράγωγα της υβριδικής σύντηξης EWS-FLI1 αρχικά υπεβλήθησαν σε διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε 2% γέλη αγαρόζης και στη συνέχεια έγιναν ορατά με χρώση με ethidium bromide. Ως θετικός μάρτυρας control χρησιμοποιήθηκε εν παραλλήλω το RNA από την EWS/PNET κυτταρική σειρά SK-ES το οποίο εκφράζει τύπου 2 μεταγράφημα EWS-FLI1.

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν εν παραλλήλω ένα δείγμα το οποίο περιείχε μόνο αντιδραστήρια (απουσία DNA) και ένα δείγμα το οποίο δεν περιείχε αντίστροφη μεταγραφάση. Προκειμένου να πιστοποιηθεί η παρουσία τόσο άθικτου RNA όσο και ενισχυθέντος cDNA κάθε παράγωγο της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφάσης υπεβλήθη σε σύγχρονη ποιοτική και ποσοτική δοκιμασία ανάλυσης με εκκινητές (primers) για την έκφραση γονιδίων ζωτικών λειτουργιών (housekeeping genes) όπως το γονίδιο της β-ακτίνης.

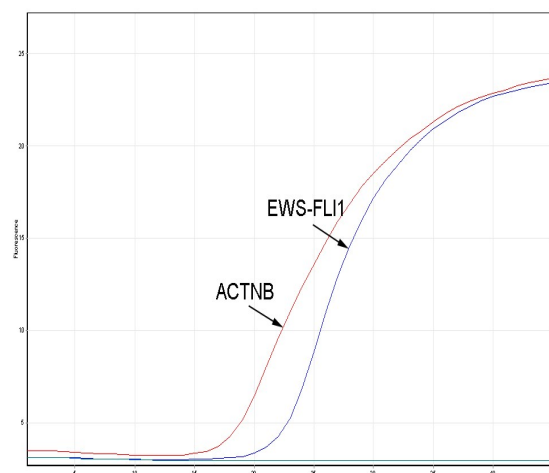
DNA sequencing: Προσδιορισμός – ανάλυση της αλληλουχίας του DNA. Τα παράγωγα της RT-PCR κλωνοποιήθηκαν εντός του φορέα (vector) pCR2.1 χρησιμοποιώντας το TA Cloning kit [Invitrogen, Carlsbad, CA, USA] και στη συνέχεια υπεβλήθησαν σε προσδιορισμό αλληλουχίας (sequencing) χρησιμοποιώντας το Taq dideoxy terminator cycle sequencing kit [Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA] και μία φθορίζουσα συσκευή προσδιορισμού αλληλουχίας DNA fluorescent DNA sequencer [373A, Applied Biosystems Inc.]. Η ανάλυση – προσδιορισμός της DNA αλληλουχίας διευκολύνθηκε από βασικό τοπικό εργαλείο ανίχνευσης ευθυγράμμισης και ομοιότητας αλληλουχιών (basic local alignment search tool sequence similarity searches) με την χρήση της βάσης δεδομένων National Center for Biotechnology Information database [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/].

Αποτελέσματα για Quantitative Real Time reverse transcriptase PCR approach

Ποσοτικοποίηση του εξαθθέντος RNA από τον ιστό με φασματοφωτομετρία κατέδειξε συνολική απομόνωση ~ 3 μg RNA με άριστη καθαρότητα το οποίο στη συνέχεια υπεβλήθη σε μετατροπή σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με random primers και reverse transcriptase. Τεκμηριώθηκε η παρουσία του υβριδικού m-RNA μεταγραφήματος EWSR/FLI-1 σύντηξης στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων της ασθενούς.

Η ποιότητα του απομονωθέντος RNA από το βιοπτικό υλικό πιστοποιήθηκε από την παρουσία και το μοριακό βάρος του γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene) της β-ακτίνης ACTNB.

a. Αποτελέσματα της PCR σε πραγματικό χρόνο για το εξεταζόμενο υλικό.

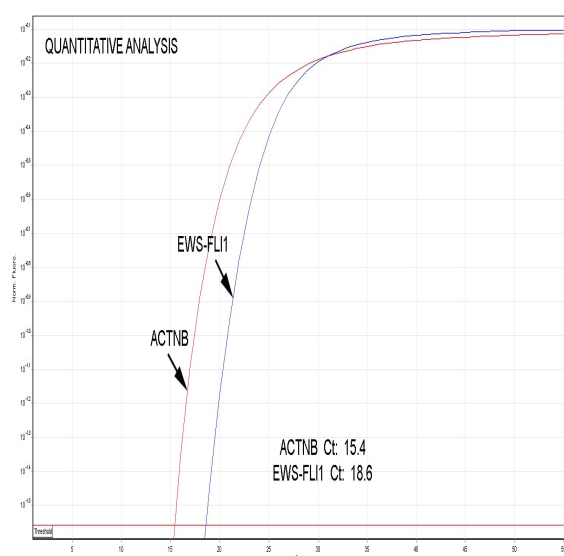


Εικόνα 12. Απεικονίζονται οι καμπύλες σύνθεσης που δείχνουν τη σύνθεση σε πραγματικό χρόνο και την ποσοτική διαφορά έκφρασης των αλληλουχιών για τα αναλυθέντα γονίδια (ACTNB και EWS-FLI1) που δείχνονται με βέλη. Παρατηρείται ενίσχυση της σύνθεσης του υβριδικού EWS-FLI1 μεταγραφήματος (καμπύλη μπλέ χρώματος).

b. Quantitative Values (Ct-values) όπου αναδεικνύεται η καμπύλη του κάθε γονιδίου όπως ενισχύεται από τον αριθμό κύκλων PCR διατέμνοντας στον προκαθορισμένο ουδό τον άξονα των x και όπως ανιχνεύεται από την ένταση φθορισμού στον άξονα των y.

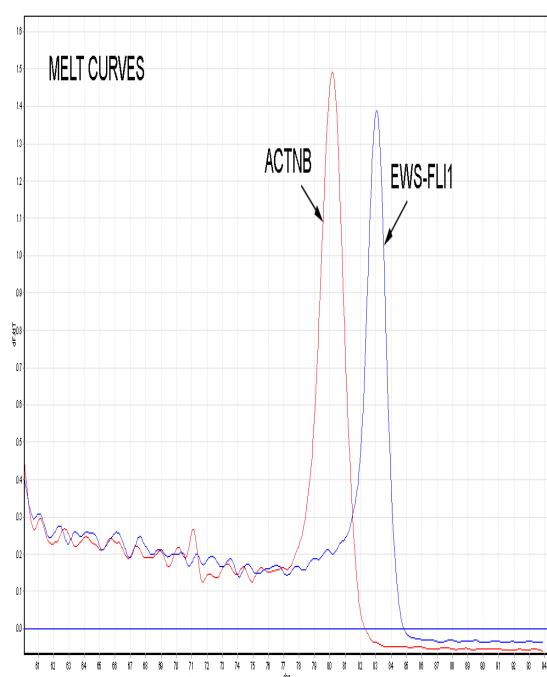
Η υπολογισθείσα, για το υβριδικό γονίδιο σύντηξης EWS-FLI1, Ct value εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή τιμή, αφού υπολείπεται κατά μόλις 3.2 κύκλους της Ct value του housekeeping gene.

Ως εκ τούτου, στην ασθενή, εκτιμάται υψηλή ενίσχυση και υπερέκφραση του EWS-FLI1 υβριδικού γονιδίου σύντηξης.



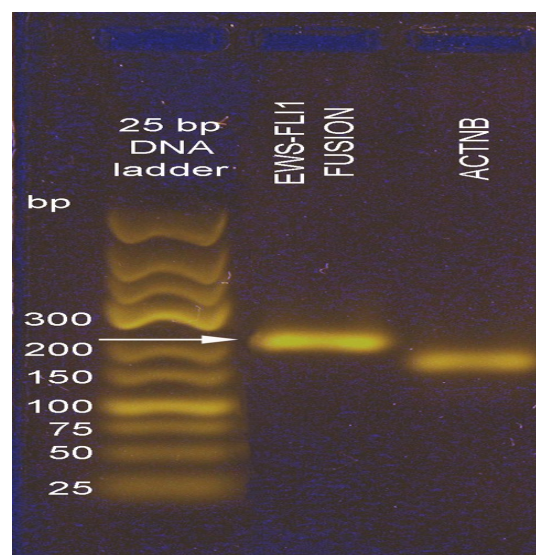
Εικόνα 13. Ποσοτική ανάλυση των προϊόντων της PCR με υπολογισμό της Ct value στους 15.4 κύκλους για το housekeeping gene της β-ακτίνης και στους 18.6 κύκλους για το EWS-FLI1 υβριδικό γονίδιο σύντηξης.

c. Επιβεβαίωση της ορθότητας των προϊόντων της PCR με τις αντίστοιχες καμπύλες τήξης (Melt curve analysis) σε εύρος θερμοκρασιών 60-90 °C.



Εικόνα 14. Καταγραφή καμπυλών τήξης (melt curves) για την ACTNB και για το υβριδικό EWS-FLI1 μεταγράφημα. Πιστοποιήθηκε η ορθότητα των αποτελεσμάτων της PCR για την παρουσία του υβριδικού μεταγραφήματος της EWS-FLI-1

d. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε γέλη αгарόζης και πιστοποίηση του μεγέθους αυτών με βάση το μοριακό βάρος.



Εικόνα 15. Πιστοποιείται, στα προϊόντα της PCR, η παρουσία τόσο του μεταγραφήματος της β-ακτίνης (μεγέθους 183 bp) όσο και του υβριδικού μεταγραφήματος της EWS-FLI1. Το μέγεθος 277 bp του EWS-FLI1 υβριδικού μεταγραφήματος είναι ενδεικτικό του είδους της σύντηξης (EWS εξώνιο 7 στο FLI-1 εξώνιο 6).

Β) Προτεινόμενες μοριακές τεχνικές προς διερεύνηση και ταυτοποίηση της πιθανότητας συμμετοχής καινούριων γονιδίων/μονοπατιών στην παθοβιολογία του σαρκώματος EWING

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα συμμετοχής καινούριων γονιδίων/μονοπατιών στην παθοβιολογία του σαρκώματος Ewing οι εκάστοτε μοριακές τεχνικές θα πρέπει να εφαρμοσθούν σε προαπαιτούμενο κατάλληλο βιολογικό υπόστρωμα από το νεόπλασμα της ασθενούς. Το προαπαιτούμενο βιολογικό υπόστρωμα το οποίο απομονώσαμε στο εργαστηριό μας συνίσταται σε:

1. Πρωτογενή κυτταροκαλλιέργεια (primary culture),
2. Γονιδίωμα (genome)
3. Μεταγράφημα (transcriptome)
4. Πρωτέωμα (proteome)

Μέθοδοι – Αποτελέσματα

1. Δημιουργία πρωτογενούς κυτταροκαλλιέργειας από τον φρέσκο ιστό (primary cell culture). Απομόνωση των κυττάρων από τον πρωτογενή ιστό με Τρυψίνη: Διαμερισμός του ιστού σε τεμαχίδια πάχους 3-4mm με αποστειρωμένο νυστέρι. Πλύσεις με ισότονο αποστειρωμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ελεύθερο ασβεστίου ή μαγνησίου, καθίζηση τεμαχιδίων ιστού και απομάκρυνση υπερκείμενου x 2-3 επαναλήψεις,

Τοποθέτηση σε πάγο, προσθήκη 0.25% τρυψίνης - 1 ml τρυψίνης για κάθε 100 mg ιστού - στο ισότονο αποστειρωμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ελεύθερο ασβεστίου ή μαγνησίου, με τον ιστό. Επώαση στους 4°C για 6 έως 18 ώρες προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η διήθηση από την τρυψίνη. Απόσταξη και απομάκρυνση της τρυψίνης. Επώαση εκ νέου με τρυψίνη στους 37°C για 20-30 min. Προσθήκη θερμού πλήρους μέσου με αναστολέα τρυψίνης από σόγια. Διήθηση του κυτταρικού εναιωρήματος διαμέσου ανοξειδωτού φίλτρου με πόρους διαμέτρου 100 έως 200 μM. Σπορά των κυττάρων εντός τριβλίου (monolayer) ή δοκιμαστικού σωλήνα (suspension) με κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (pooled blood serum, fetal calf serum, κατάλληλα αντιβιοτικά).

Απομόνωση των κυττάρων από τον πρωτογενή ιστό με Κολλαγενάση: Διαμερισμός του ιστού σε τεμαχίδια πάχους 3-4 mm με αποστειρωμένο νυστέρι. Πλύσεις με Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). Προσθήκη κολλαγενάσης 50 – 200 U/ml HBSS. Επώαση στους 37°C για 4 έως 18 ώρες. Προσθήκη 3mM CaCl₂ διεκονώνει την αποδιάταξη. Διήθηση του κυτταρικού εναιωρήματος διαμέσου ανοξειδωτού φίλτρου με πόρους διαμέτρου 100 έως 200 μM. Φυγοκέντρηση εντός HBSS. Επαναδιαλυτοποίηση των σφαιριδίων κυτταρικού ιζήματος της ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο. Σπορά των κυττάρων εντός τριβλίου (monolayer) ή δοκιμαστικού σωλήνα (suspension) με κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (pooled blood serum, fetal calf serum κατάλληλα αντιβιοτικά).

Επανάληψη της διαδικασίας για πρωτογενή καλλιέργεια φυσιολογικών πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων από το μυελό των οστών της ασθενούς.

2. Εξαγωγή και απομόνωση του συνολικού γονιδιώματος (genome). Η εξαγωγή και απομόνωση του DNA έλαβε χώρα τόσο στο φρέσκο διατηρημένο σε βαθιά ψύξη (-80°C) νεοπλασματικό ιστό, όσο και στον μονιμοποιημένο σε φορμαλίνη και εμβυθισμένο σε παραφίνη νεοπλασματικό ιστό της ασθενούς. Εξαγωγή και Απομόνωση DNA από φρέσκο νεοπλασματικό ιστό: τοποθέτηση ελάχιστης ποσότητας 0.1 ml νεοπλασματικού ιστού σε μικροσωλήνα μέγιστης χωρητικότητας 1.5 ml. Παρασκευή

500 ml ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής – απομόνωσης (extraction buffer): [10 ml 5M stock NaCl 0.1 M, 10 ml 1M pH 8.0 Tris 20mM, 25 ml 0.5M pH 8.0 EDTA 25mM, 2.5g SDS 0.5%, 455 ml ddH₂O, διήθηση διαμέσου φίλτρου με μέγεθος πόρων 0.45mm και αποστείρωση σε αυτόκαυστο] Προσθήκη 0.2 ml ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής – απομόνωσης (extraction buffer). Σύνθλιψη του ιστού με καθαρό αποστειρωμένο έμβολο, μέχρις πλήρους διασκόρπισης. Απομάκρυνση του εμβόλου και προσθήκη επιπλέον 0.3ml extraction buffer. Πρόσθεση 50ul από διάλυμα πρωτεϊνάσης K (stock = 10mg/ml). Επιπωματίωση και ενσφράγιση του δοκιμαστικού σωλήνα. Ήπια ανάδευση και ανάμειξη. Επώαση σε θερμοκοιτίδα στους 55°C για χρονικό διάστημα 12 ωρών έως 3 ημερών με περιοδική έντονη δόνηση προς ανάδευση. Επισκόπηση των δειγμάτων και διασφάλιση ότι έχουν αποκτήσει υγρή φάση χωρίς άπεπτα τεμαχίδια ιστού. Απομάκρυνση των δειγμάτων από την θερμοκοιτίδα, τοποθέτηση σε Hood και εφαρμογή άσηπτης τεχνικής με γάντια και διόπτρες ασφαλείας. Αποπωματισμός των δειγμάτων και προσθήκη 0.7-0.8 ml PCI (phenol: chloroform: IAA). Επιπωματισμός και δόνηση σε Vortex για 2-5 min. Φυγοκέντρηση για 3-5 min στις 12.000 rpm. Προσεκτική αναρρόφηση 400-500 ul υπερκείμενης διαυγούς υδατικής φάσης - χωρίς την ενδιάμεση φάση - και διοχέτευσης αυτών σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης. Προσθήκη 40-50 ul 3M NaAc pH 5.3, επιπωματισμός και ανάδευση. Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 100 %. Αναδέυση προς καθίζηση του DNA. Φύλαξη στους -20°C για χρονικό διάστημα από 10 min έως 24 ώρες. Φυγοκέντρηση για 2-20 min στις 12.000 rpm. Απομάκρυνση της υδατικής υπερκείμενης φάσης με αναρρόφηση. Προσθήκη 1.0 ml αιθανόλης 70-80% για πλύση των σφαιριδίων του ιζήματος. Φύλαξη στους 4°C για χρονικό διάστημα από 20 min έως 48 ώρες. Φυγοκέντρηση σφαιριδίων για 3-5 min στις 12.000 rpm. Απομάκρυνση της αιθανόλης με αναρρόφηση. Αποξήρανση των σφαιριδίων του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5-30 min. Προσθήκη 100-300 ul διαλύματος TE και εκ νέου επαναδιαλυτοποίηση και εναιώρηση στους 4°C. Έλεγχος της συγκέντρωσης του DNA με σπινθηρομέτρηση/φθορισμομετρία και της ποιότητας του DNA με ηλεκτροφόρηση σε

γέλη.Εξαγωγή και Απομόνωση DNA από μονιμοποιημένο σε φορμαλίνη και εμβυθισμένο σε παραφίνη νεοπλασματικό ιστό: Τομές πάχους 10 μm σε μικροτόμο και συλλογή σε πλαστικούς μικροσωλήνες χωρητικότητας 1.5 ml και τήξη σε αυτόκαυστο. Προσθήκη 1 ml ξυλένη για 30 min x 2 επαναλήψεις. Προσθήκη 100% και 75% αιθανόλη x 2 επαναλήψεις.

Πλύσεις για 15 min με PBS x 2 επαναλήψεις. Προσθήκη 500 μl lysis buffer (50 μl πρωτεϊνάση K 20 mgr/ml, 10 μl διαλύματος Tris-HCl 1M, 2 μl EDTA 0.5M, 100 μl SDS 10%, 838 ml ddH₂O). Επώαση στους 52°C ολονυκτίς έως πλήρους διαλυτοποίησης του συνόλου των ιστικών τεμαχιδίων. Προσθήκη στον αποπαραφινωμένο ιστό 500 μl phenol:chloroform:isopropanol σε αναλογία αλκοόλης 25:24:1. Ανάδευση με Vortex. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min στις 12.000 x g. Μεταφορά του υπερκείμενου σε μικροσωλήνα αυτόκαυστου με 100 μl πιπέτα. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου στο υπερκείμενο, ανάδευση με Vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 12.000 x g. Προσεκτική αναρρόφηση της υπερκείμενης διαυγούς υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε αποστειρωμένο μικροσωλήνα. Προσθήκη 0.1 όγκου οξικού νατρίου 3M, ανάδευση με vortex, προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης και επώαση ολονυκτίς στους -20°C. Το DNA καθιζάνει ως ίζημα και φυγοκεντρείται για 5-10 min στους 4°C και στις 12.000 x g. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσεις με 75% αιθανόλη. Περαιτέρω φυγοκέντρηση και συλλογή του DNA. Αποξήρανση του DNA ιζήματος και επαναδιαλυτοποίησή του σε Hood με 50 μl ddH₂O.

Επανάληψη της διαδικασίας για το γονιδίωμα (genome) του φυσιολογικού πρόδρομου μεσεγχυματικού κυττάρου από το μυελό των οστών της ασθενούς.

3. Περαιτέρω κάθαρση του ολικού RNA για χρησιμοποίησή του σε πειραματική μεθοδολογία

c-DNA μικροσυστοιχιών (c-DNA microarrays). Εξαγωγή και απομόνωση του συνολικού μεταγραφώματος (transcriptome)

Περαιτέρω κάθαρση του ολικού RNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο TRIZOL με τη χρήση του RNeasy cleanup protocol.

Συμπλήρωση στο δείγμα ολικού RNA με DEPC-treated water [Ambion] μέχρι τελικού όγκου 100 μl. Προσθήκη 350 μl ρυθμιστικού Buffer RLT (προσθήκη 10 μl β-μερκαπτοαιθανόλη Sigma για κάθε 1 ml Buffer RLT πριν τη χρήση) στο δείγμα και εκτενής ανάδευση.

Προσθήκη 250 μl απόλυτης αιθανόλης [Ultrapure, American Bioanalytical] στο δείγμα. Ανάμειξη καλή με πέρασμα από πιπέτα για 2-3 φορές. Εφαρμογή 700 μl του δείγματος, συμπεριλαμβανομένου και τυχόν υπάρχοντος ιζήματος, σε μία στήλη RNeasy mini spin column [RNeasy RNA Isolation Kit, Qiagen] η οποία τοποθετείται εντός δοκιμαστικού σωλήνα χωρητικότητας 2 ml. Επώαση της στήλης για 5 min. Φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο με 1.5 ml σωλήνα περιστροφής σε πλήρη ισχύ για 15 sec. Επανάληψη της διαδικασίας με εφαρμογή του δείγματος για 2^η φορά σε μία στήλη RNeasy mini spin column [RNeasy RNA Isolation Kit, Qiagen] προκειμένου να αυξηθεί ο βαθμός πρόσδεσης του RNA στην RNeasy μεμβράνη.

Φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο με 1.5 ml σωλήνα περιστροφής σε πλήρη ισχύ για 15 sec. Μεταφορά της στήλης RNeasy column εντός καινούριου δοκιμαστικού σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 2 ml. Διαφύλαξη της ροής του δείγματος διαμέσου της στήλης μέχρι την πλήρη συλλογή και ποσοτικοποίησή του. Προσθήκη 500 μl Buffer RPE (4 όγκοι απόλυτης αιθανόλης σε 1 όγκο συμπυκνωμένου διαλύματος Buffer RPE έτοιμου προς παρασκευή) επί της στήλης RNeasy column και φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο με 1.5 ml σωλήνα περιστροφής σε πλήρη ισχύ για 15 sec. Αποβολή της ροής του δείγματος διαμέσου της στήλης. Επανάληψη χρήσης του ίδιου δοκιμαστικού σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 2 ml.

Προσθήκη 500 μl Buffer RPE (4 όγκοι απόλυτης αιθανόλης σε 1 όγκο συμπυκνωμένου διαλύματος Buffer RPE έτοιμου προς παρασκευή) επί της στήλης RNeasy column και φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο με 1.5 ml σωλήνα περιστροφής σε πλήρη ισχύ για 2 min προκειμένου να αφυδατωθεί και να αποξηρανθεί η RNeasy μεμβράνη και να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα ίχνη αιθανόλης τα οποία θα μειώσουν την

ανάκτηση του RNA. Τοποθέτηση της στήλης RNeasy spin column εντός καινούριου δοκιμαστικού σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 2 ml. Αποβολή του σωλήνα συλλογής και φιλτράρισμα. Φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο σε πλήρη ισχύ για 2 min. Μεταφορά της στήλης RNeasy spin column εντός καινούριου δοκιμαστικού σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 1.5 ml. Παραμονή για 10 min με ανοιχτό στόμιο προκειμένου να ολοκληρωθεί πλήρως η εξάτμιση της αιθανόλης. Επίθεση 40μl DEPC-treated water απευθείας στο κέντρο της RNeasy μεμβράνης. Αναμονή για 1 min. Φυγοκέντρηση για 1 min σε μέγιστη ισχύ προκειμένου να γίνει έκλουση. Επανάληψη της επίθεσης με 30μl DEPC-treated water απευθείας στο κέντρο της RNeasy μεμβράνης προκειμένου να ανακτηθεί το σύνολο του δεσμευμένου RNA. Αναμονή για 1 min. Φυγοκέντρηση για 1 min σε μέγιστη ισχύ προκειμένου να γίνει έκλουση. Ανάλυση Φασματοφωτομετρίας. Διάλυση 1 μl RNA σε 39μl DEPC-treated water [1:40 διάλυση]. Χρησιμοποιώντας μικροκυψελίδα χωρητικότητας 10 μl προχωράμε σε μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 260 nm και στα 280 nm προκειμένου να καθορίσουμε τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του δείγματος. Ο λόγος A_{260} / A_{280} πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 1.8 με τη συμβατική αποδοχή ότι 1 OD στα 260 nm ισοδυναμεί με 40 mgr/ml RNA. Ηλεκτροφόρηση 0.5 mgr έως 1 mgr RNA σε φυσική native γέλη αгарόζης 1% ή 0.5 mgr έως 1 mgr RNA επί ενός Agilent Bioanalyzer gel image chip προκειμένου να εκτιμηθεί η ποιότητα και η καθαρότητα του RNA.

Το pattern ηλεκτροφόρησης στην γέλη ανέδειξε δύο μείζονες ζώνες (bands) αποτελούμενες από 28 S και 18 S RNA με ταυτόχρονη πλήρη απουσία επιχρίσματος (smear) από γενωμικό DNA. Επανάληψη της διαδικασίας για το ολικό μεταγράφημα (transcriptome) του φυσιολογικού πρόδρομου μεσεγχυματικού κυττάρου από το μυελό των οστών της ασθενούς.

4. Απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από το φρέσκο νεοπλασματικό ιστό της ασθενούς. Εξαγωγή και απομόνωση του συνολικού πρωτεώματος

Το ολικό ακατέργαστο εκχύλισμα τόσο από τον φρέσκο νεοπλασματικό ιστό όσο και από τον φρέσκο ιστό φυσιολογικού μυελού των

οστών υποβάλλεται σε ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση. Απομόνωση/Απόσπαση πρωτεϊνών από φρέσκο ή κατεψυγμένο ιστό: Καθαρισμό του ομογενοποιητή Homogenizer με 10% λευκαντικό (bleach) X2, 100% αιθανόλη X2 και dH₂O X2. Παρασκευή του αντιδραστηρίου απομόνωσης πρωτεϊνών (extraction reagent) με 300 μl M-PER Reagent [M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent: Pierce, Cat. 78503, purple vial, stored at 4°C] και με 3 μl Protease and Phosphatase Inhibitor [Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail: Thermo, Cat. 78440, white bottle, stored at 4°C] για κάθε δείγμα ιστού. Κατανομή του μείγματος του αντιδραστηρίου απομόνωσης πρωτεϊνών σε πλαστικούς σωλήνες. Προετοιμασία ξηρού πάγου. Καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης πρωτεϊνών από την τοποθέτηση των πρωτεϊνών στο ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης (extraction buffer) και μέχρι ολοκλήρωσης της διαδικασίας τα δείγματα διατηρούνται εντός ξηρού πάγου προς αποφυγή αποδόμησης και απενεργοποίησης των πρωτεϊνών.

Απόσπαση με το άκρο μίας πιπέτας ιστικού δείγματος φρέσκου ιστού από τον φρέσκο ιστό τον φυλασσόμενο εντός του erppendorf στους -80°C και τοποθέτηση του ιστικού δείγματος εντός του πλαστικού σωλήνα που περιέχει αντιδραστήριο απομόνωσης πρωτεϊνών.

Ομογενοποίηση των φρέσκων ιστών σε κλίμακα 30 για 20-30 seconds. Μεταφορά σε erppendorf και επώαση σε πάγο για 10 min. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 13000 rpm για 10 min. Προετοιμασία του ρυθμιστικού δείγματος (sample buffer) εντός του παρασκευαστηρίου (hood) σε ποσότητα 250 μl buffer/δείγμα ιστού (tissue sample) αποτελούμενο από 237.5 μl Laemmli Sample buffer [Bio-Rad, blue, store at RT] και από 12.5 μl β-ME. Κατανομή σε erppendorf των 250 μl sample buffer και προσθήκη ισόποσου όγκου (250 μl) από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης του ομογενοποιημένου σε erppendorf. Επώαση μετά από ασφαλή επιπωματισμό στους 70-100°C για 5 min σε (heat block). Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C. Επανάληψη της διαδικασίας για το πρωτέωμα (proteome) του φυσιολογικού πρόδρομου μεσεγχυματικού κυττάρου από το μυελό των οστών της ασθενούς.

Συζήτηση επί των Αποτελεσμάτων και επί της Προτεινόμενης Μεθοδολογίας

Με την προαναφερόμενη μεθοδολογία επετεύχθησαν αφ' ενός μεν η τεκμηριωμένη κυτταρομοριακή διάγνωση, αφ' ετέρου δε η απόκτηση πρωτογενούς κυτταροκαλλιέργειας και η απομόνωση του συνόλου του γονιδιώματος, του μεταγραφώματος και του πρωτεώματος από τον νεοπλασματικό ιστό της ασθενούς. Στην συζήτηση που ακολουθεί θα επιχειρήσουμε να παραθέσουμε τις προτεινόμενες μοριακές τεχνικές που θα πρέπει να εφαρμοσθούν προκειμένου να διερευνήσουμε και να ταυτοποιήσουμε την πιθανότητα συμμετοχής καινούριων γονιδίων/μονοπατιών στην παθολογία του σαρκώματος EWING.

Η αρχική προσέγγιση ιδεατά θα πρέπει να ξεκινήσει από το ολικό πρωτογενές μετάγραφο, τόσο του νεοπλασματικού κυττάρου όσο και του φυσιολογικού πρόδρομου μεσεγχυματικού κυττάρου από το μυελό των οστών της ασθενούς. από το οποίο με χρωματογραφία συγγένειας με σφαιρίδια σημασμένα με poly-T θα λάβουμε μετά από έκλουση το καθαρό m-RNA. Επεξεργασία με αντίστροφη μεταγραφάση θα οδηγήσει στα αντίστοιχα σημασμένα με διαφορετικό φθορισμό c-DNA's τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σε πείραμα μικροσυστοιχιών για εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων του chip της μικροσυστοιχίας. Ο καθορισμός του επιπέδου της γονιδιακής έκφρασης στη μεθοδολογία των c-DNA's microarrays υπολογίζεται με ανάλυση εικόνας σε ποιοτική και ημιποσοτική κλίμακα ανάλογα με τις σχετικές διαβαθμίσεις της έντασης του φθορισμού.

Σε επιλεγμένα γονίδια από το chip της μικροσυστοιχίας, όπου η ποιοτική και ημιποσοτική κλίμακα των c-DNA's microarrays δεν μας παρέχει την απαιτούμενη ευαισθησία και ακρίβεια των αποτελεσμάτων της έκφρασης των εν λόγω γονιδίων, θα ακολουθήσει ακριβέστερη ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του πειράματος των cDNA μικροσυστοιχιών με ποσοτική πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής PCR.

Σύγκριση του πρωτογενούς μεταγραφώματος με τα ενισχυθέντα, όπως προκύπτουν από το πείραμα των μικροσυστοιχιών, m-RNA's με ηλεκτροφόρηση RNA κατά Northern

προκειμένου να ανιχνευθούν περιπτώσεις εναλλακτικού ματίσματος (Alternative RNA Splicing).

Ακολουθώντας από το μεταγράφημα θα μεταβούμε στο πρωτέωμα με μεθοδολογία έρευνας αρχικά πρωτεομική και στη συνέχεια φωσφοπρωτεωμική.

Σε μία πρώτη φάση διαχωρισμός των πρωτεϊνών

με διαφορική φυγοκέντρηση με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους,

φυγοκέντρηση με βάση την ταχύτητα καθίζησης σε συνεχή ήπια σταθεροποιο βραδείωση συγκρότησης 5-20%,

φυγοκέντρηση με βάση την ανωτική πυκνότητα με καθίζηση ισορροπίας σε απότομη βραδείωση πυκνότητας συγκρότησης 20-70%,

χρωματογραφία στήλης (ιοντοανταλλακτική, με διήθηση σε πηκτή, χημικής συγγένειας, ανοσοσυγγένειας),

ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (1^η διάσταση με ισοηλεκτρική εστίαση σε πηκτή με αμφολύτες, 2^η διάσταση μετά από θέρμανση και επώαση αρχικά με μερκαπτοαιθανόλη και στη συνέχεια με SDS σε πηκτή πολυακρυλαμίδης)

και τέλος με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF / Electrospray Spectrometry.

Στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός της κάθε πρωτεΐνης

με ενζυμο-σύνδετη-ανοσο-προσοροφητική μέθοδο (έμμεση ή διπλή) ELISA ή ραδιενεργό μέθοδο RIA.

Ακολουθεί καθορισμός της πρωτοταγούς αλληλουχίας των αμινοξέων κάθε πρωτεΐνης (protein sequencing)

είτε άμεσα (μετά από επιλεκτική διάσπαση με θρυψίνη, κλωστριπαΐνη, σταφυλοκοκκική πρωτεάση, υδροξυλαμίνη, 2-Νίτρο-5-θειοκυανοβενζοϊκό, O-Ιωδοσοβενζοϊκό και βρωμιούχο κυάνιο σε ολιγοπεπτίδια και επαναληπτική χημική μέθοδο Edman απελευθέρωσης του αμινοτελικού αμινοξέος και ταυτοποίησή του με υγρή χρωματογραφία στήλης υψηλής πίεσης συγκριτικά με πρότυπο χρωματογράφημα αμινοξέων)

είτε έμμεσα από την αλληλουχία του c-DNA (απευθείας με λογισμικό αν είναι γνωστή η αλληλουχία του c-DNA ή στην περίπτωση που είναι άγνωστη η αλληλουχία του c-DNA εναλλακτικά, μετά από την αναγώριση 20 – 50 αρχικών αμινοξέων μιας πρωτεΐνης σχεδιασμός ενός εκφυλισμένου DNA ιχνηθέτη

και ανίχνευση με υβριδισμό του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, κλωνοποίηση του γονιδίου ή του cDNA με PCR και ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου με ενζυμική μεθοδολογία κατά Sanger DNA sequencing χρησιμοποιώντας δι-δεοξυ ανάλογα νουκλεοτιδίων και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και από την αλληλουχία του cDNA καθορισμός της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης).

Κλωνοποίηση με εισαγωγή του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπό μελέτη πρωτεΐνη μέσω διαμεταθετών στοιχείων (transposon elements) σε ευκαρυωτικά κύτταρα κατά προτίμηση πρόδρομα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών θα μας παρέχει την υπό μελέτη πρωτεΐνη σε μεγάλη ποσότητα.

Στο επόμενο στάδιο οι υπό μελέτη πρωτεΐνες θα υποβληθούν σε ανίχνευση και καθορισμό πιθανής μετά-μεταφραστικής τροποποίησης (προσδιορισμός θέσεως αρχικών δισουλφιδικών δεσμών με διαγώνια δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση πεπτιδίων σε υπερμυρμηγκικό οξύ,

με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι υδατανθρακικών ομάδων σε γλυκοπρωτεΐνες ή πρωτεογλυκάνες, με φασματομετρία μάζας που διαφοροποιεί τη γλυκοζυλιωμένη από τη μη-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη με βάση τη μοριακή μάζα,

με μεθοδολογία ανίχνευσης υδατανθρακικών ομάδων

[διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση και ακολούθως χρώση Periodic acid-Schiff stain, επώαση κυτταροκαλλιέργειας κυττάρων που φέρουν γλυκοπρωτεΐνες σε ραδιενεργό καλλιεργητικό μέσο σε ζώνες ραδιενεργού αποδόμησης και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων υδατανθράκων μετά από διαχωρισμό σε ηλεκτροφόρηση, επώαση με κατάλληλα ένζυμα ένδο- ή έξω-γλυκοσιδάση ή φωσφολιπάσες οδηγεί σε αλλαγές στην ηλεκτροφορητική μετανάστευση που βοηθούν στο διαχωρισμό ανάμεσα σε πρωτεΐνες με N-γλυκοζιτικό δεσμό, O-γλυκοζιτικό δεσμό ή GPI – linkages καθώς και μεταξύ υψηλών σε μαννόζη και περίπλοκων N-γλυκανών, χρωματογραφία στήλης αγαρόζης-λεκτίνης,

χρωματογραφία συγγένειας λεκτίνης προκειμένου να διαχωρίσουμε και να παραλάβουμε σε καθαρή μορφή γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκοπεπτίδια τα οποία

εμφανίζουν συγγένεια για σύνδεση με την ειδική λεκτίνη που χρησιμοποιήθηκε, ηλεκτροφόρηση συγγένειας με λεκτίνη όπου αλλαγές στην ηλεκτροφορητική μετανάστευση βοηθούν στον διαχωρισμό και χαρακτηρισμό γλυκομορφών, δηλαδή μορφών της ίδιας γλυκοπρωτεΐνης που διαφέρουν ως προς το είδος και το μέγεθος της υδατανθρακικής αλυσίδας,

όξινη υδρόλυση και ανάλυση ιδιοστατικών που βοηθά στην αναγνώριση υδατανθρακικών ομάδων επί των πρωτεϊνών και στον καθορισμό της στοιχειομετρίας αυτών των υδατανθρακικών ομάδων, ανάλυση μεθυλίωσης δεσμών που μας βοηθά στον καθορισμό των δεσμών που υπάρχουν ανάμεσα στις υδατανθρακικές ομάδες των σακχάρων,

φασματομετρία μάζας η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με την μοριακή μάζα, τη σύσταση, την αλληλουχία ή και την μορφή διακλάδωσης μιας υδατανθρακικής αλυσίδας, NMR φασματομετρία η οποία ταυτοποιεί σάκχαρα, αναγνωρίζει την αλληλουχία τους, τους δεσμούς μεταξύ των ομάδων τους καθώς και την ανωμερή φύση (anomeric nature) της γλυκοσιδικής αλυσίδας,

Μέτρηση Παρεμβολής Διπλής Πόλωσης (Dual Polarisation Interferometry) η οποία είναι τεχνική μέτρησης των μηχανισμών που ενέχονται και προκαλούν τις βιομοριακές αλληλεπιδράσεις όπως ρυθμοί αντίδρασης, συγγένειες και των σχετιζόμενων με τους μηχανισμούς αυτούς αλλαγών στη στερεοδιαμόρφωση,

Σκέδαση πολλαπλής γωνίας δέσμης φωτός (Multi-angle light scattering) η οποία σε συνδυασμό με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, με φασματοσκοπία απορρόφησης στο υπεριώδες και στο ορατό, και με διαφορική διαθλασιμετρία, παρέχει πληροφορίες για τη μοριακή μάζα, την αναλογία πρωτεΐνης προς υδατάνθρακα, την κατάσταση συσσωμάτωσης, το μέγεθος και την διακλάδωση της υδατανθρακικής αλυσίδας. Επιπλέον σε συνδυασμό με ανάλυση βαθμίδωσης συστατικών, αναλύει την αυτο- και έτερο- συσχέτιση προκειμένου να καθορίσει την δεσμευτική συγγένεια (binding affinity) και τη στοιχειομετρία με πρωτεΐνες ή υδατάνθρακες σε διάλυμα χωρίς σήμανση].

Θα ακολουθήσει η φωσφοπρωτεομική με προσδιορισμό των φωσφορυλιωμένων

πρωτεϊνών (καταλοίπων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης)

είτε με μονοκλωνικά αντισώματα κατά των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων αμινοξέων επί του στυλώματος νιτροκυτταρίνης (Western Blot, SDS PAGE ανάλυση ανοσοκαθίλωσης σε εκχυλίσματα πρωτεϊνών Immunoblot analysis on protein extracts από το φρέσκο νεοπλασματικό ιστό,

με μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία να αναγνωρίζουν είτε τις ολικές πρωτεΐνες, είτε τις φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών στην περίπτωση που τα εν λόγω γονίδια κωδικοποιούν για ένζυμα φωσφορυλίωσης, είτε πρωτεΐνες που να ενέχονται σε σχετικά μονοπάτια μεταβίβασης σήματος),

είτε με Φασματομετρία μάζας που διαφοροποιεί τη φωσφορυλιωμένη από τη μη-φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη με βάση τη μοριακή μάζα.

Στη συνέχεια θα ακολουθήσει διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης στο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος μέσω αναστολής της έκφρασής της (κυτταροκαλλιέργεια με anti-sense small interfering RNA's, διαγονιδιακά συστήματα επίμυος knock-out για το γονίδιο της υπό μελέτη πρωτεΐνης είτε στο σύνολο των κυττάρων του διαγονιδιακού οργανισμού, είτε επιλεκτικά στα πρόδρομα MSC του μυελού των οστών, διαγονιδιακά συστήματα επίμυος knock-in για το παθολογικό γονίδιο της EWS-FLI1 της υπό μελέτη πρωτεΐνης είτε στο σύνολο των κυττάρων του διαγονιδιακού οργανισμού, είτε επιλεκτικά στα πρόδρομα MSC του μυελού των οστών).

Κριτικής σημασίας είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών στο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος (με χρωματογραφία στήλης ανοσοσυγγένειας για ανίχνευση της πρωτεΐνης partner, με φασματοσκοπία μάζας για ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης εκ των 2 υποψήφιων, με μονοκλωνικά αντισώματα για ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης εκ των 2 υποψήφιων, με ομοιοπολική σύνδεση με κατάλληλου μήκους συνδέτες προκειμένου να εκτιμηθεί ο βαθμός γειτνίασης μεταξύ πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής επιφανείας, με φθορίζοντα αντισώματα και λήψη μικροσκοπίας φθορισμού σε διαφορετικές χρονικές στιγμές για να ελεγχθεί η

ενδοκυττάρωση της μεμβρανικής ή εξωκυττάριας πρωτεΐνης).

Σε περίπτωση που τεθεί υποψία για πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το DNA π.χ. ως μεταγραφικός παράγοντας θα διενεργηθεί μεθοδολογία DNA foot-printing στο γονιδίωμα με παρατήρηση shifting στην ηλεκτροφορητική εικόνα.

Σε περίπτωση που κάποια πρωτεΐνη κριθεί ύποπτη για ιστική διείσδυση θα μελετηθεί ο ρόλος της knock-in και knock-out κυτταροκαλλιέργειες σε υλικό τριών διαστάσεων 3-D gel.

Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης (ηλεκτρονική και κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία, κρυσταλλογραφία ακτίνων X, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR αρχικά μονοδιάστατη και στη συνέχεια διδιάστατη ενισχυμένη φασματοσκοπία πυρήνων κατά Overhauser – NOESY με επέκταση της ακρίβειας της μεθόδου με ενσωμάτωση ραδιενεργών ατόμων άνθρακα ¹³C, αζώτου ¹⁵N και υδρογόνου ²H στην πολυπεπτιδική αλυσίδα είτε ομοιόμορφα καθόλο το μήκος αυτής είτε σε συγκεκριμένες θέσεις με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, προσομοίωση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης με σύγκριση με τις 2000 περίπου γνωστές τρισδιάστατες διαμορφώσεις μέσα από βάσεις δεδομένων (Protein Data Bank) και με τον τρόπο αυτό εξαγωγή συμπερασμάτων για την πιθανή στερεοδιαμόρφωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης (διαδικασία γνωστή ως Protein Threading). Το καταληκτικό βήμα είναι η ανάλυση της καταλυτικής περιοχής δράσης της πρωτεΐνης και του μηχανισμού δράσης (κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων που έχουν χαρακτηριστεί ως κριτικής σημασίας - ύποπτα - για τη βιοχημική της δράση, υπολογιστική χημεία για ανάδειξη των μετασταθών/μεταβατικών διεγερμένων καταστάσεων πιθανοκρατική εξομοίωση Monte Carlo, μοριακή δυναμική του φαινομένου με εμπειρική μεθοδολογία μοριακής μηχανικής, ημι-εμπειρική μεθοδολογία ηλεκτρονιακής δομής, θεωρία συναρτησιακού πυκνότητας και θεωρία κυμματοσυναρτήσεων από πρώτες αρχές ab-initio) προκειμένου να σχεδιαστεί αναστολέας που θα προσομοιάζει με τις μετασταθείς

περιορισμένο χώρο του πυρήνα. Μελέτες καθορισμού αλληλουχίας μετά από ανοσοκαθίζηση χρωματίνης σε πρόδρομα μεσεγχευματικά κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με σάρκωμα Ewing είναι πολύ πιθανό να καταδείξουν νέα δυναμικά ρυθμιστικά του γονιδιώματος στοιχεία (genome regulatory elements) τα οποία ενέχονται στην διαμετάθεση και με τον τρόπο αυτό να αποκαλύψουν τους μηχανισμούς που πυροδοτούν τις γενετικές αστάθειες που χαρακτηρίζουν τα νεοπλασματικά ES κύτταρα και συνοδεύουν την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου.

Η μελέτη της νόσου ιδεατά στο μέλλον αναμένεται να διενεργηθεί σε GEM συστήματα στα οποία θα λάβει χώρα εκτενής ανάλυση της παθογένειας σε πολλαπλά επίπεδα (Γενετικό, Επιγενετικό, Μεταγραφικό και Πρωτεομικό επίπεδο) προκειμένου να τεκμηριωθούν στόχοι για σχεδιασμό θεραπευτικών στρατηγικών. Σε γενετικό επίπεδο επίπεδο θα αναδειχθούν ρυθμιστικές αλληλουχίες (υποκινητές και ενισχυτές) και ποικιλίες γονιδιακών μεταβολών (εναλλακτικές θέσεις διαμετάθεσης, μεταλλάξεις, καρυστυπικές αλλαγές). Σε επιγενετικό επίπεδο θα ελεγχθεί η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων για παράδειγμα μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή ή μέσω μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των ιστονών. Σε μεταγραφικό επίπεδο οι μικροσυστοιχίες cDNA ποσοτικοποιούν αλλαγές στο μεταγράφημα. Σε πρωτεομικό επίπεδο, η μεθοδολογία της πρωτεομικής θα

μας επιτρέψει να αναδείξουμε τα μονοπάτια μεταβίβασης σήματος που επηρεάζονται από την δυσλειτουργική EWSR1-FLI1/ETS χίμαιρα, καθώς θα τεκμηριώσει και θα ποσοτικοποιήσει αλλαγές στη συγκέντρωση, στην αλληλουχία και στη μετά-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών που επάγονται είτε άμεσα είτε έμμεσα από τη EWSR1-FLI1/ETS χίμαιρα.

Θα ακολουθήσει ανάδειξη της στερεοδιαμόρφωσης και καθορισμός των καρτεσιανών

και internal Z-matrix συντεταγμένων των ατόμων στο χώρο τόσο της EWSR1-FLI1/ETS χίμαιρας όσο και άλλων πρωτεϊνών στόχων που πιθανότατα θα προκύψουν, με κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία, κρυσταλλογραφία, φασματοσκοπία NMR, υπολογιστική προσομοίωση με γνωστά μοντέλα πρωτεϊνικής στερεοδιαμόρφωσης-protein threading και υπολογιστική χημεία (πιθανοκρατική εξομοίωση Monte Carlo, εμπειρική μεθοδολογία μοριακής μηχανικής, ημι-εμπειρική μεθοδολογία ηλεκτρονιακής δομής, θεωρία συναρτησιακού πυκνότητας και από πρώτες αρχές ab-initio). Η ακριβής χαρτογράφηση των ενεργών καταλυτικών περιοχών θα βοηθήσει στην ανάδειξη μεταβατικών/μετασταθών καταστάσεων (transition state) και στο σχεδιασμό αναστολέων των ενεργών κέντρων της EWSR1-FLI1/ETS χίμαιρας και των ετέρων υποψήφιων πρωτεϊνικών στόχων με τελικό επιθυμητό αποτέλεσμα την θεραπεία της νόσου.

REFERENCES

1. Kovar H., Aryee D., Zoubek A.. The Ewing family of tumors and the search for the Achilles' heel. *Curr Opin Oncol* 1999;11:275-84
2. J. L. Ordóñez, D. Osuna, D. Herrero, E. de Álava, and J. Madoz-Guàrdia. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Research*, vol. 69, no. 18, pp. 7140-7150, 2009
3. M. Kauer, J. Ban, R. Kofler et al. A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS ONE*, vol. 4, no. 4, Article ID e5415, 2009.
4. Kovar H, Dworzak M, Strehl S, Schnell E, Ambros IM, Ambros PF, et al. Overexpression of the pseudoautosomal

gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* 1990;5:1067-70.

5. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991;67:1886-93.

6. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ. Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma

cell surface antigen p30/32MIC2. *Am J Pathol* 1991;139:317-25.

7. Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, et al. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 2010;120:668-80.

8. Sohn HW, Choi EY, Kim SH, Lee IS, Chung DH, Sung UA, et al. Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin-independent pathway in Ewing's sarcoma cells. *Am J Pathol* 1998;153:1937-45.

9. Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, Manara MC, Benini S, Serra M, et al. CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. *Cancer Res* 2000;60:5134-42.

10. Blondheim NR, Levy YS, Ben-Zur T, Burshtein A, Cherlow T, Kan J, et al. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev* 2006;15:141-64.

11. Hancock JD, Lessnick SL. A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI1 gene expression signature. *Cell Cycle* 2008;7:250-6.

12. P.P. Lin, Y. Wang, and G. Lozano. Mesenchymal stem cells and the origin of Ewing's sarcoma. *Sarcoma*, vol. 2011, Article ID 276463, 8 pages, 2011.

13. A.O. Cavazzana, J. S. Miser, J. Jefferson, and T.J. Triche. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *American Journal of Pathology*, vol. 127, no. 3, pp. 507-518, 1987.

14. C.-H. Suh, N.G. Ordóñez, J. Hicks and B. Mackay. Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors. *Ultrastructural Pathology*, vol. 26, no. 2, pp. 67-76, 2002.

15. S.L. Lessnick, C.S. Dacwag, and T.R. Colub. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI1 induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell*, vol 1, no 4, pp. 393-401, 2002.

16. C.J. Rorie, V. D. Thomas, P. Chen, H.H. Pierce, J.P. O'Bryan and B.E. Weissman. The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma /

peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Research*, vol 64, no. 4, pp. 1266-1277, 2004.

17. S. Hu-Lieskovan, J. Zhang, L. Wu, H. Shimada, D.E. Schofield, and T.J. Triche. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Research*, vol. 65, no. 11, pp. 4633-4644, 2005.

18. M.A. Teitell, A.D. Thompson, P.H.B. Sorensen, H. Shimada, T.J. Triche, and C.T. Denny. EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Laboratory Investigation*, vol. 79, no. 12, pp. 1535-1543, 1999.

19. Y. Castellero-Trejo, S. Eliazar, L. Xiang, J.A. Richardson, and R.L. Ilaria Jr. Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells results in EWS/FLI-1-dependent, Ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Research*, vol 65, no 19, pp. 8698-8705, 2005.

20. N. Riggi, L. Cironi, P. Provero et al. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow - derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Research*, vol. 65, no 24, pp. 11459-11468, 2005.

21. E.C. Torchia, S. Jaishankar, and S.J. Baker. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Research*, vol 63, no. 13, pp. 3464-3468, 2003.

22. N. Riggi, M.-L. Suvá, D. Suvá, et al. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, vol.68,no.7,pp.2176-2185, 2008.

23. N. Riggi, M.-L. Suvá, and I. Stamenkovic. Ewing's sarcoma origin: from duel to duality. *Expert Review of Anticancer Therapy*, vol.9, no.8, pp. 1025-1030, 2009.

24. C. von Levetzow, X. Jiang, Y. Gwye et al. Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, Article ID e19305, 2011.

25. Riggi N., Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 2007;254:1-10.

26. Arvand A., Denny C.T. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001;20:5747-54.
27. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer* 1995;75:203-10.
28. De Alava E, Lozano MD, Patino A, Sierrasesumaga L, Pardo-Mindan FJ. Ewing family tumors: potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:152-7.
29. Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, et al. Modern diagnostic methods in the Ewing's sarcoma family: Six patients with histologic soft tissue tumors. *EMBO J* 1993;12:4481-7.
30. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* 1992;359:162-5.
31. Arvand A. and Denny C.T. Biology of EWS/ ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001; vol20,no. 40 pp. 5747-54.
32. Ida K., Kobayashi S., Taki T., Hanada R., Bessho F., Yamamori S., Sugimoto T., Ohki M., Hayashi Y. *Int. J. Cancer*, 63, 500-504, (1995).
33. Prasad D.D., Rao V.N., Reddy E.S., *Cancer Res.*, 52, 5833-5837, (1992).
34. Sjögren H., Meis-Kindblom J., Kindblom L.G., Aman P., Stenman G. *Cancer Res.*, 59, 5064-5067 (1999).
35. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* 1992;359:162-5.
36. Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, May WA. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 1995;10:423-31.
37. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, et al. DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 1994;14:3230-41.
38. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:827-37.
39. Bachmaier R, Aryee DN, Jug G, Kauer M, Kreppel M, Lee KA, et al. O-GlcNAcylation is involved in the transcriptional activity of EWS-FLI1 in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 2009;28:1280-4.
40. Klevernic IV, Morton S, Davis RJ, Cohen P. Phosphorylation of Ewing's sarcoma protein (EWS) and EWS-Fli1 in response to DNA damage. *Biochem J* 2009;418:625-34.
41. Avigad S, Shukla S, Naumov I, Cohen IJ, Ash S, Meller I, et al. Aberrant methylation and reduced expression of RASSF1A in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:1023-8.
42. EC Toomey, JD Schiffman, and SL Lessnick. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Onco-gene*, vol. 29, no. 32, pp. 4504-4516, 2010
43. May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, et al. The Ewing's Sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 1993;13:7393-8.
44. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Dellatre O, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:5752-6.
45. Ohno T, Rao VN, Reddy ES. EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator 1. *Cancer Res* 1993;53:5859-63.
46. Uren A, Toretsky JA. Ewing's sarcoma oncoprotein EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent. *Future Oncol* 2005;1:521-8.
47. Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN, Reddy ES. The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA-binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* 1994;9:3087-97.
48. Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, et

- al. Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 1996;37:1-8.
49. Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J* 1996;15:5022-31.
50. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, et al. DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 1994;14:3230-41.
51. Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The ETS family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1993;211:7-18.
52. Sementchenko VI, Watson DK. ETS target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000;19:6533-48.
53. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:827-37.
54. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Dellatre O, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5752-6.
55. Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, et al. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10149-54.
56. Gangwal K, Lessnick SL. Microsatellites are EWS/FLI response elements: genomic "junk" is EWS/FLI's treasure. *Cell Cycle* 2008;7:3127-32.
57. Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyyev A, Barillot E, Delattre O. The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS One* 2009;4:4932.
58. Luo W, Gangwal K, Sankar S, Boucher KM, Thomas D, Lessnick SL. GSTM4 is a microsatellite-containing EWS/ FLI target involved in Ewing's sarcoma oncogenesis and therapeutic resistance. *Oncogene* 2009;28:4126-32.
59. Uren A, Toretsky JA. Ewing's sarcoma oncoprotein EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent. *Future Oncol*, vol. 1, no. 4., pp. 521-528 2005.
60. S. Kim, CT Denny, and R. Wisdom. Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 7, pp. 2467-2478, 2006.
61. L. Cironi, N. Riggi, P. Provero, et al. IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. *PLoS ONE*, vol. 3, no. 7, Article ID e2634, 2008.
62. MR Sollazzo, MS Benassi, G. Magagnoli et al. Increased c-myc oncogene expression in Ewing's sarcoma: correlation with Ki67 proliferation index. *Tumori*, vol. 85, no. 3, pp.167-173, 1999.
63. D. Herrero-Martín, D. Osuna, J. L. Ordóñez et al. Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signaling and reveals TOPK as a new target. *British Journal of Cancer*, vol. 101, no. 1, pp. 80-90, 2009.
64. R Smith, LA Owen, DJ Trem et al. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 405-416, 2006.
65. M. Fukuma, H. Okita, J.-I. Hata, and A. Umezawa. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, vol. 22, no 1, pp. 1-9, 2003.
66. E. García-Aragoncillo, J. Carrillo, E. Lalli, et al. DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. *Oncogene*, vol. 27, no. 46, pp. 6034-6043, 2008.
67. J.P. Zwerner, J. Joo, K.L. Warner et al. The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. *Oncogene*, vol. 27, no. 23, pp. 3282-3291, 2008.
68. G.H.S. Richter, S. Plehm, A. Fasan, et al. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, no. 13, pp. 5324-5329, 2009.

69. C. Siligan, J. Ban, R. Bachmaier et al. EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene*, vol. 24, no. 15, pp. 2512-2524, 2005.

70. R. Kikuchi, M. Murakami, S. Sobue et al. Ewing's sarcoma fusion protein, EWS/Fli-1 and Fli-1 protein induce PLD2 but not PLD1 gene expression by binding to an ETS domain of 5' promoter. *Oncogene*, vol. 26, no. 12, pp. 1802-1810, 2007.

71. K.-B. Hahm, K. Cho, C. Lee et al. Repression of the gene encoding the TGF- β type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nature Genetics*, vol. 23, no. 2, pp. 222-227, 1999.

72. F. Nakatani, K. Tanaka, R. Sakimura et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 17, pp. 15105-15115, 2003.

73. L. Dauphinot, C. de Oliveira, T. Melot et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene*, vol. 20, no. 25, pp. 3258-3265, 2001.

74. A. Prieur, F. Tirode, P. Cohen, and O. Delattre. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveals downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 16, pp. 7275-7283, 2004.

75. N. Riggi, M.-L. Suvá, C. de Vito et al. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming towards Ewing's sarcoma cancer stem cells. *Genes and Development*, vol. 24, no. 9, pp. 916-932, 2010.

76. Martins AS, Ordóñez J. L., Garcia-Sanchez A. et al. A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study. *Cancer Res* 2008;68:6260-70.

77. Petermann R, Mossier BM, Aryee DN, Khazak V, Golemis EA, Kovar H. Oncogenic

EWS-Fli-1 interacts with hsRBP7, a subunit of human RNA polymerase II. *Oncogene*, 1998;17:603-10.

78. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 2000;218:235-59.

79. Watanabe G, Nishimori H, Irifune H, et al. Induction of tenascin-C by tumor-specific EWS-ETS fusion genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:224-32.

80. Deneen B, Welford SM, Ho T, Hernandez F, Kurland I, Denny CT. PIM3 proto-oncogene kinase is a common transcriptional target of divergent EWS/ETS oncoproteins. *Mol Cell Biol* 2003;23:3897-908.

81. Nishimori H, Sasaki Y, Yoshida K, et al. The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2002;21:8302-9.

82. M. Fukuma, H. Okita, J.-I. Hata, and A. Umezawa. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, vol. 22, no 1, pp. 1-9, 2003.

83. Fuchs B, Inwards C, Scully SP, Janknecht R. hTERT is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. *Clin Orthop* 2004;64-8.

84. Abaan OD, Levenson A, Khan O, Furth PA, Uren A, Toretsky JA. PTPL1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 and modulates Ewing's sarcoma tumorigenesis. *Oncogene* 2005;24:2715-22.

85. R. Kikuchi, M. Murakami, S. Sobue et al. Ewing's sarcoma fusion protein, EWS/Fli-1 and Fli-1 protein induce PLD2 but not PLD1 gene expression by binding to an ETS domain of 5' promoter. *Oncogene*, vol. 26, no. 12, pp. 1802-1810, 2007.

86. Nozawa S, Ohno T, Banno Y, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor-induced cell growth signaling by a short interfering RNA for EWS-Fli1 via down regulation of phospholipase D2 in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem* 2005;280:27544-51.

87. Wishart MJ, Dixon JE. Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions

for unique protein-interaction domains. *Trends Biochem Sci* 1998;23:301-6.

88. C. Siligan, J. Ban, R. Bachmaier et al. EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene*, vol. 24, no. 15, pp. 2512-2524, 2005.

89. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemo-resistance. *Nat Cell Biol* 2005;7:591-600.

90. Scotlandi K, Benini S, Sarti M, et al. Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma / peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res* 1996;56:4570-4.

91. L. Cironi, N. Riggi, P. Provero, et al. IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. *PloS ONE*, vol. 3, no. 7, Article ID e2634, 2008.

92. E. García-Aragoncillo, J. Carrillo, E. Lalli, et al. DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. *Oncogene*, vol. 27, no. 46, pp. 6034-6043, 2008.

93. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366:701-4.

94. F. Nakatani, K. Tanaka, R. Sakimura et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 17, pp. 15105-15115, 2003.

95. K.-B. Hahm, K. Cho, C. Lee et al. Repression of the gene encoding the TGF- β type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nature Genetics*, vol. 23, no. 2, pp. 222-227, 1999.

96. Im YH, Kim HT, Lee C, et al. EWS-FLI-1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor β type II receptor gene. *Cancer Res* 2000;60:1536-40.

97. A. Prieur, F. Tirode, P. Cohen, and O. Delattre. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveals downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like

growth factor binding protein 3. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 16, pp. 7275-7283, 2004.

98. Thompson L, Chang B, Barsky SH. Monoclonal origins of malignant mixed tumors (carcinosarcomas). Evidence for a divergent histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1996;20:277-85.

99. May WA, Arvand A, Thompson AD, Braun BS, Wright M, Denny CT. EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat Genet* 1997;17:495-7.

100. Arvand A, Bastians H, Welford SM, Thompson AD, Ruderman JV, Denny CT. EWS/FLI1 up regulates mE2-C, a cyclin-selective ubiquitin conjugating enzyme involved in cyclin B destruction. *Oncogene* 1998;17:2039-45.

101. Wai DH, Schaefer KL, Schramm A et al. Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int J Oncol* 2002;20:441-51.

102. Yang Y, Zhang L, Wei Y, et al. Neural differentiation arrest in embryonal carcinoma cells with forced expression of EWS-FLI1. *J Neurooncol* 2008;90:141-50.

103. N. Riggi, M.-L. Suvá, D. Suvá, et al. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, vol. 68, no. 7, pp. 2176-2185, 2008

104. D. Herrero-Martín, D. Osuna, J. L. Ordóñez et al. Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signaling and reveals TOPK as a new target. *British Journal of Cancer*, vol. 101, no. 1, pp. 80-90, 2009.

105. M. Fukuma, H. Okita, J.-I. Hata, and A. Umezawa. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, vol. 22, no 1, pp. 1-9, 2003.

106. Wai DH, Schaefer KL, Schramm A et al. Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int J Oncol* 2002;20:441-51.

107. Hayward DG, Clarke RB, Faragher AJ, Pillai MR, Hagan IM, Fry AM. The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in

- human breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:7370-6.
108. MR Sollazzo, MS Benassi, G. Magagnoli et al. Increased c-myc oncogene expression in Ewing's sarcoma: correlation with Ki67 proliferation index. *Tumori*, vol. 85, no. 3, pp.167-173, 1999.
109. Deneen B, Hamidi H, Denny CT. Functional analysis of the EWS/ETS target gene uridine phosphorylase. *Cancer Res* 2003;63:4268-74.
110. R Smith, LA Owen, DJ Trem et al. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 405-416, 2006.
111. Carrillo J, Garcia-Aragoncillo E, Azorin D et al. Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. *Clin Cancer Res* 2007;13:2429-40.
112. Uren A, Merchant MS, Sun CJ, et al. β -platelet-derived growth factor receptor mediates motility and growth of Ewing's sarcoma cells. *Oncogene* 2003;22:2334-42.
113. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, et al. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res* 2006;66:9937-47.
114. Cerisano V, Aalto Y, Perdichizzi S et al. Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators. *Oncogene* 2004;23:5664-74.
115. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003;22:5323-35.
116. Matsunobu T, Tanaka K, Nakamura T, et al. The possible role of EWS-Fli1 in evasion of senescence in Ewing family tumors. *Cancer Res* 2006;66:803-11.
117. L. Dauphinot, C. de Oliveira, T. Melot et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene*, vol. 20, no. 25, pp. 3258-3265, 2001.
118. Amsellem V, Kryszke MH, Hervy M et al. The actin cytoskeleton-associated protein zyxin acts as a tumor suppressor in Ewing's tumor cells. *Exp Cell Res* 2005;304:443-56.
119. Mackintosh C, J. Madoz-Gürpide, J. L. Ordóñez, D. Osuna and D. Herrero-Martín. The molecular pathogenesis of Ewing sarcoma. *Cancer Biology & Therapy*. 2010;9: 9,655-667, 2010.
120. Owen LA, Kowalewski AA, Lessnick SL. EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS ONE* 2008;3:e1965
121. Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med* 2009;15:750-6.
122. Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, Abaan OD, Parvin JD, Cripe TP, et al. Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res* 2006;66:5574-81.
123. De Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, et al. EWS-Fli1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1248-55.
124. Kim J, Pelletier J. Molecular genetics of chromosome translocation involving EWS and related family members. *Physiol Genomics* 1999;1:127-38.
125. Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES. Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 1995;11:1049-54.
126. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Dellatre O, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5752-6.
127. Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-Fli1 antisense oligonucleotide inhibits

- proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 1997;99:239-47.
128. Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y. Downregulation and forced expression of EWS-Flil fusion gene results in changes in the expression of G1 regulatory genes. *Br J Cancer* 2001;84:768-75.
129. F. Nakatani, K. Tanaka, R. Sakimura, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Flil oncogenic fusion protein. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 17, pp. 15105-15115, 2003.
130. Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel MA. *Genes Dev*, 8, 1270-1284 (1994)
131. Lasorella A, Iavarone A, Israel MA. *Mol Cell Biol*, 16, 2570-2578, (1996).
132. Paronetto MP. Ewing Sarcoma Protein: A Key Player in Human Cancer. A Review Article. *International Journal of Cell Biology*, Volume 2013, Article ID 642853, 12 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/642853>
133. Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, May WA. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 1995;10:423-31.
134. Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN, Reddy ES. The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA-binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* 1994;9:3087-97.
135. Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, et al. Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 1996;37:1-8.
136. Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J* 1996;15:5022-31.
137. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, et al. DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 1994;14:3230-41.
138. Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The ETS family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1993;211:7-18.
139. Martins AS, Mackintosh C, Martin DH, et al. Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006;12:3532-40.
140. Zanini C, Giribaldi G, Mandili G, et al. Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing's sarcoma cell lines. *J Neurochem* 2007;103:1344-54.
141. Gazziola C, Cordani N, Carta S, De Lorenzo E, Colombatti A, Perris R. The relative endogenous expression levels of the IFNAR2 isoforms influence the cytostatic and pro-apoptotic effect of IFN α on pleomorphic sarcoma cells. *Int J Oncol* 2005;26:129-40.
142. Martins AS, Ordóñez J. L., Garcia-Sanchez A. et al. A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study. *Cancer Res* 2008;68:6260-70.
143. Martins AS, Mackintosh C, Martin DH, et al. Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006;12:3532-40.
144. Fuchs B, Inwards C, Scully SP, Janknecht R. hTERT is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. *Clin Orthop* 2004;64-8.
145. Zanini C, Giribaldi G, Mandili G, et al. Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing's sarcoma cell lines. *J Neurochem* 2007;103:1344-54.

146. Gazziola C, Cordani N, Carta S, De Lorenzo E, Colombatti A, Perris R. The relative endogenous expression levels of the IFNAR2 isoforms influence the cytostatic and pro-apoptotic effect of IFN α on pleomorphic sarcoma cells. *Int J Oncol* 2005;26:129-40.
147. S. Kim, CT Denny, and R. Wisdom. Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 7, pp. 2467-2478, 2006.
148. Petermann R, Mossier BM, Aryee DN, Khazak V, Golemis EA, Kovar H. Oncogenic EWS-Fli-1 interacts with hSRP7, a subunit of human RNA polymerase II. *Oncogene*, 1998;17:603-10.
149. F. Nakatani, K. Tanaka, R. Sakimura, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 17, pp. 15105-15115, 2003.
150. Ban J, Bennani-Baiti IM, Kauer M, Schaefer KL, Poremba C, Jug G, et al. EWS-FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2008;68:7100-9.
151. Li Y, Tanaka K, Fan X, Nakatani F, Li X, Nakamura T, et al. Inhibition of the transcriptional function of p53 by EWS-Fli1 chimeric protein in Ewing family tumors. *Cancer Lett* 2010;294:57-65.
152. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844-8.
153. H. Ichikawa, K. Shimizu, Y. Hayashi, and M. Ohki. An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Cancer Research*, vol. 54, no 11, pp.2865-2868, 1994
154. D. Herrero-Martín, A. Fourtouna, S. Niedan, LT Riedmann, R. Schwentner, and DNT Aryee. Factors affecting EWS-FLI1 activity in Ewing's sarcoma. *Sarcoma*, vol. 2011, Article ID 352580, 11 pages, 2011.
155. D. Herrero-Martín, D. Osuna, J. L. Ordóñez et al. Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signaling and reveals TOPK as a new target. *British Journal of Cancer*, vol. 101, no. 1, pp. 80-90, 2009.
156. Scotlandi K, Benini S, Nanni P, et al. Blockage of insulin-like growth factor-1 receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res* 1998;58:4127-31.
157. Baird K, Davis S, Antonescu CR, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res* 2005;65:9226-35.
158. Uren A, Wolf V, Sun YF, Azari A, Rubin JS, Toretsky JA. Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43:243-9.
159. Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, et al. Blockage of insulin-like growth factor-1 receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res* 1998;58:4127-31.
160. D. Herrero-Martín, D. Osuna, J. L. Ordóñez, Sevillano V, Martins AS, Mackintosh C, et al. Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signaling and reveals TOPK as a new target. *British Journal of Cancer*, vol. 101, no. 1, pp. 80-90, 2009.
161. Benini S, Manara MC, Cerisano V, Perdichizzi S, Strammiello R, Serra M, et al. Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. *Int J Cancer* 2004;108:358-66.
162. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res* 2005;65:9226-35.
163. Uren A, Wolf V, Sun YF, Azari A, Rubin JS, Toretsky JA. Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43:243-9.
164. Endo Y, Beauchamp E, Woods D, Taylor WG, Toretsky JA, Uren A, et al. Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via Frizzled3 and c-Jun N-terminal kinase

- dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2008;28:2368-79.
165. Navarro D, Agra N, Pestaña A, Alonso J, González-Sancho JM. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes beta-catenin/TCF-mediated transcription. *Carcinogenesis* 2009; 31: 394-401.
166. Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, et al. Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:40-51.
167. Radig K, Schneider-Stock R, Rose I, Mittler U, Oda Y, Roessner A. p53 and ras mutations in Ewing's sarcoma. *Pathol Res Pract* 1998;194:157-62.
168. Tsuchiya T, Sekine K, Hinohara S, Namiki T, Nobori T, Kaneko Y. Analysis of the p16^{INK4}, p14^{ARF}, p15, TP53 and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120:91-8.
169. Park YK, Chi SG, Kim YW, Park HR, Unni KK. p53 mutations in Ewing's sarcoma. *Oncol Rep* 2001;8:533-7.
170. Amir G, Issakov J, Meller I, Sucher E, Peyser A, Cohen IJ, et al. Expression of p53 gene product and cell proliferation marker Ki-67 in Ewing's sarcoma: correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 2002;33:170-4.
171. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, et al. Prognostic impact of p53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000;89:783-92.
172. Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, et al. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 1997;15:2225-32.
173. Wei G, Antonescu CR, de Alava E, Leung D, Huvos AG, Meyers PA, et al. Prognostic impact of INK4 deletion in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000;89:793-9.
174. Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Lab Invest* 2001;81:803-14.
175. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, et al. Ewing sarcoma with p53 mutation or p16/p14^{ARF} homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 2005;23:548-58.
176. Wai DH, Schaefer KL, Schramm A, Korsching E, Van Valen F, Ozaki T, et al. Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int J Oncol* 2002;20:441-51.
177. Brisset S, Schleiermacher G, Peter M, Mairal A, Oberlin O, Delattre O, et al. CGH analysis of secondary genetic changes in Ewing tumors: correlation with metastatic disease in a series of 43 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;130:57-61.
178. Ozaki T, Paulussen M, Poremba C, Brinkschmidt C, Rerim J, Ahrens S, et al. Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:164-71.
179. Hattinger CM, Potschger U, Tarkkanen M, Squire J, Zielenska M, Kiuru-Kuhlefelt S, et al. Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. *Br J Cancer* 2002;86:1763-9.
180. Brownhill SC, Taylor C, Burchill SA. Chromosome 9p21 gene copy number and prognostic significance of p16 in ESFT. *Br J Cancer* 2007;96:1914-23.
181. Savola S, Nardi F, Scotlandi K, Picci P, Knuutila S. Microdeletions in 9p21.3 induce false negative results in CDKN2A FISH analysis of Ewing sarcoma. *Cytogenet Genome Res* 2007;119:21-6.
182. Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, Acquadro F, Largo C, Suela J, et al. Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 2008;27:2084-90.
183. Roberts P, Burchill SA, Brownhill S, Cullinane CJ, Johnston C, Griffiths MJ, et al. Ploidy and karyotype complexity are powerful prognostic indicators in the Ewing's sarcoma family of tumors: a study by the United Kingdom Cancer Cytogenetics and the Children's

- Cancer and Leukemia Group. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:207-20.
184. Savola S, Klami A, Tripathi A, Niini T, Serra M, Picci P, et al. Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. *BMC Cancer* 2009;9:17.
185. Tarkkanen M, Kiuru-Kuhlefelt S, Blomqvist C, Armengol G, Bohling T, Ekfors T, et al. Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridization in Ewing sarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114:35-41.
186. Knuutila S, Armengol G, Bjorkqvist AM, el-Rifai W, Larramendy ML, Monni O, et al. Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one clinical-pathological entity. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;100:25-30.
187. Berghuis D, de Hooge AS, Santos SJ, et al. Reduced human leukocyte antigen expression in advanced-stage Ewing sarcoma: implications for immune recognition. *J Pathol* 2009;218:222-31.
188. de Hooge AS, Berghuis D, Santos SJ, et al. Expression of cellular FLICE inhibitory protein, caspase-8, and protease inhibitor-9 in Ewing sarcoma and implications for susceptibility to cytotoxic pathways. *Clin Cancer Res* 2007;13:206-14.
189. Fulda S, Küfer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001;20:5865-77.
190. Verhoeven DH, de Hooge AS, Mooiman EC, Santos SJ, ten Dam MM, Gelderblom H, et al. NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Mol Immunol* 2008;45:3917-25.
191. Zhou Z, Bolontrade MF, Reddy K, Duan X, Guan H, Yu L, et al. Suppression of Ewing's sarcoma tumor growth, tumor vessel formation and vasculogenesis following anti vascular endothelial growth factor receptor-2 therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:4867-73.
192. Guan H, Zhou Z, Cao Y, Duan X, Kleinerman ES. VEGF165 promotes the osteolytic bone destruction of Ewing's sarcoma tumors by upregulating RANKL. *Oncol Res* 2009;18:117-25.
193. Wang YX, Mandal D, Wang S, Hughes D, Pollock RE, Lev D, et al. Inhibiting platelet-derived growth factor beta reduces Ewing's sarcoma growth and metastasis in a novel orthotopic human xenograft model. *In Vivo* 2009;23:903-9.
194. Schadler KL, Zweidler-McKay PA, Guan H, Kleinerman ES. Delta-like ligand 4 plays a critical role in pericyte/vascular smooth muscle cell formation during vasculogenesis and tumor vessel expansion in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:848-56.
195. Yu L, Su B, Hollomon M, Deng Y, Facchinetti V, Kleinerman ES. Vasculogenesis driven by bone marrow-derived cells is essential for growth of Ewing's sarcomas. *Cancer Res* 2010;70:1334-43.
196. Dalal S, Burchill SA. Preclinical evaluation of vascular-disrupting agents in Ewing's sarcoma family of tumours. *Eur J Cancer* 2009;45:713-22.
197. Dubois SG, Marina N, Glade-Bender J. Angiogenesis and vascular targeting in Ewing sarcoma: a review of preclinical and clinical data. *Cancer* 2010;116:749-57.
198. Desmaze C, Zucman J, Delattre O, et al. Unicolor and bicolor in situ hybridization in the diagnosis of peripheral neuroepithelioma and related tumors. *Genes ChromCancer* 1992;5:30-34
199. Taylor C, Patel C, Jones T, et al. Diagnosis of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumour based on the detection of t(11;22) using fluorescence in situ hybridization. *Br J Cancer* 1993;67:128-133.
200. McManus AP, Gusterson BA, Pinkerton CR, et al. Diagnosis of Ewing's sarcoma and related tumours by detection of chromosome 22q12 translocations using fluorescence in situ hybridizations on tumour touch imprints. *J Pathol* 1995;176:137-142.
201. Desmaze C, Zucman J, Delattre O, et al. Interphase molecular cytogenetics of Ewing's sarcoma and

- peripheral neuroepithelioma t(11;22) with flanking and overlapping cosmid probes. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;74:13-18.
202. Desmaze C, Aurias A. In situ hybridization of fluorescent probes on chromosomes, nuclei or stretched DNA: applications in physical mapping and characterization of genomic rearrangements. *Cell Mol Biol*. 1995;141:925-931.
203. Qian X, Jin L, Shearer BM, et al. Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2005;14:23-28.
204. Perry A, Aldape KD, George DH, et al. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer* 2004; 101: 2318-2326.
205. Kumar S, Pack S, Kumar D, et al. Detection of EWS-FLI-1 fusion in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor by fluorescence in situ hybridization using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Hum Pathol* 1999;30:324-330.
206. Downing JR, Head DR, Parham DM, et al. Detection of the t(11;22)(q24-q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993;143:1294-1300
207. Qian X, Jin L, Shearer BM, et al. Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2005;14:23-28.
208. Hill DA, O'Sullivan MJ, Zhu X, et al. Practical application of molecular genetic testing as an aid to the surgical pathologic diagnosis of sarcomas. A prospective study. *Am J Surg Pathol* 2002;26:965-977.
209. O'Sullivan MJ, Perlman EJ, Furman J, et al. Visceral primitive peripheral neuroectodermal tumors: a clinico-pathologic and molecular study. *Hum Pathol* 2001;32:1109-1115.
210. Teitell MA, Thompson AD, Sorensen PHB, et al. EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab Invest* 1999;79:1535-1543.
211. Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57^{KIP2} and c-Myc expression. *Oncogene*, vol. 20, no. 25, pp. 3258-3265, 2001
212. Gonzalez I, Vicent S, de Alava E, Lecanda F. EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J Mol Med* 2007;85:1015-29.
213. Martins AS, Mackintosh C, Martin DH, Campos M, Hernández T, Ordóñez JL, et al. Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006;12:3532-40.
214. Vormoor J, Baersch G, Decker S, Hotfilder M, Schafer KL, Pelken L, et al. Establishment of an in vivo model for pediatric Ewing tumors by transplantation into NOD/scid mice. *Pediatr Res* 2001;49:332-41.
215. Beltinger C, Debatin KM. Murine models for experimental therapy of pediatric solid tumors with poor prognosis. *Int J Cancer* 2001;92:313-18.
216. Martins AS, Ordóñez JL, Garcia-Sanchez A, Herrero D, Sevillano V, Osuna D, et al. A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study. *Cancer Res* 2008;68:6260-70.
217. Y. Castillero-Trejo, S. Eliazar, L. Xiang, J.A. Richardson, and R.L. Ilaria Jr. Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells results in EWS/FLI-1-dependent, Ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Research*, vol 65, no 19, pp. 8698-8705, 2005.

218. Houghton PJ, Morton CL, Tucker C, Payne D, Favours E, Cole C, et al. The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:928-40.
219. N. Riggi, L. Cironi, P. Provero, M-L Suvá, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, et al. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow - derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Research*, vol. 65, no 24, pp. 11459-11468, 2005.
220. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2005;65:8984-92.
221. Scotlandi K, Benini S, Manara MC, Serra M, Nanni P, Lollini PL, et al. Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma. *J Orthop Res* 2000;18:959-66.
222. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 2007;7:645-58.
223. Osborne CS, Clakalova L, Mitchell JA, et al. Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol* 2007;5:e192.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Φ. Καρβελάς, Π. Πατρικάκος, Π. Δημητρίου, Α. Τσαμπασβίλι, Ν. Λαζούρκο

Χειρουργική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, «Ο Άγιος Ανδρέας»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο πρώιμος καρκίνος του μαστού αποτελεί το 50-60% των καρκίνων του μαστού. Η προληπτική εξέταση με μαστογραφία έχει αυξήσει το ποσοστό των πρώιμων καρκίνων από 30-40% (προ 20-30 έτη), στα σημερινά υψηλά ποσοστά. Για τους χειρουργούς μαστού πρώιμος καρκίνος χαρακτηρίζεται ένας καρκίνος in situ (DCIS, CCIS), το στάδιο I,IIa, IIb, IIIa. Το μεγαλύτερο πρόβλημα που προκύπτει είναι όταν έχουμε μαστογραφικά ευρήματα τα οποία δεν είναι ψηλαφητά. Με την αύξηση των προληπτικών μαστογραφιών τα ποσοστά των μη ψηλαφητών βλαβών έχουν αυξηθεί δραματικά και η επίλυση τους απαιτεί εξειδικευμένες γνώσεις τόσο των ακτινολόγων όσο και των χειρουργών. Η χειρουργική του καρκίνου του μαστού έχει αλλάξει από το 1980 και έπειτα. Πρώτοι οι Veronesi και Fisher απέδειξαν ότι οι τεταρτεκτομές και ογκεκτομές μπορούσαν άνετα να αντικαταστήσουν τις μαστεκτομές προσφέροντας τα ίδια ποσοστά επιβίωσης ή ίασης. Έτσι από το 1990 οι ογκεκτομές εφαρμόζονται από όλους τους εξειδικευμένους χειρουργούς μαστού σε όλα τα πρώιμα στάδια. Η δειγματοληψία των μασχαλιαίων λεμφαδένων καθορίζεται από την διήθηση ή μη του πρώτου λεμφαδένα του μαστού. Σε όλες τις περιπτώσεις ογκεκτομών ή μερικών εκτομών του μαστού είναι αναγκαία η συμπληρωματική ακτινοθεραπεία. Η τοπική υποτροπή στον χειρουργηθέντα μαστό είναι μια παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν. Στις ογκεκτομές το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 1% ετησίως, ενώ στις μαστεκτομές το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 2-5% στην πρώτη δωδεκαετία.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος, μαστός, πρόληψη, μαστογραφία.

DIAGNOSTIC AND SURGICAL APPROACH OF PRIMARY BREAST CANCER

F. Karvelas, P. Patrikakos, P. Dimitriou, A. Tsabasvili, N. Lazourko

Surgery Clinic, General Hospital of Patras, "St. Andrew"

ABSTRACT

Early breast cancer accounts for 50-60% of breast cancers. Screening with mammography has increased the rate of early cancers from 30-40% (20-30 years ago), to today's high rates. For breast cancer surgeons early breast cancer is characterized as an in situ cancer (DCIS, CCIS), stage I, IIa, IIb, IIIa. The biggest problem is when we have mammographic findings that are not palpable. With the increase of screening mammograms the rates of non-palpable lesions have dramatically increased and their resolution requires specialized knowledge of both radiologists and surgeons. Breast cancer surgery has changed since 1980. Veronesi and Fisher first proved that quadrantectomy and lumpectomy could easily replace mastectomy offering the same survival or cure rates. Hence, since 1990, lumpectomy is used by all specialized breast surgeons in all early stages. Axillary lymph nodes sampling is determined by the infiltration or not of the first breast lymph node. In all cases of lumpectomy or partial excision of the breast, adjuvant radiotherapy is required. Local recurrence in the operated breast is a parameter to be considered. This percentage is about 1% yearly in lumpectomy, whereas in mastectomies range from 2% to 5% in the first 12 years.

Key words: cancer, breast, prevention, mammography.

Σημασία πρώιμης διάγνωσης

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες προσβάλλοντας περίπου το 8% του γυναικείου πληθυσμού. Τα τελευταία χρόνια η θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού έχει μειωθεί σημαντικά και αυτό οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους. Πρώτον γίνεται εκτεταμένη πρόληψη με τη χρήση διαφόρων απεικονιστικών μεθόδων και δεύτερον έχουν εξελιχθεί οι διάφορες θεραπευτικές μέθοδοι και ιδιαίτερα η χημειοθεραπεία¹.

Με την εκτεταμένη χρήση διαφόρων διαγνωστικών προληπτικών εξετάσεων σε μεγάλο ποσοστό του γυναικείου πληθυσμού όλο και συχνότερα ανακαλύπτουμε καρκίνους στα πρώιμα στάδια με αποτέλεσμα να έχουμε καλύτερη επιβίωση και τελικά μεγαλύτερα ποσοστά ίασης.

Έτσι ενώ το 1985 το ποσοστό των καρκίνων σταδίου 0 ή 1 ήταν 42% σήμερα το ποσοστό αυτό έχει ανέλθει στο 60% και αυτό είναι μια δραματικά θετική εξέλιξη². Αλλά ποιος καρκίνος μαστού μπορεί να οριστεί ως πρώιμος; Δεν υπάρχει ταύτιση απόψεων στην επιστημονική κοινότητα.

Κατ'αρχάς να τονισθεί ότι ο καρκίνος που έχει δώσει απομακρυσμένες μεταστάσεις, δηλαδή όταν έχουμε M1, δεν θεωρείται πλέον πρώιμος καρκίνος. Η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων (με ιστολογική επιβεβαίωση) από τα περισσότερα ερευνητικά κέντρα δεν θεωρείται λόγος για να μην χαρακτηρίσουμε τον καρκίνο πρώιμο³. Αυτό που κυρίως λαμβάνεται υπ'όψη είναι το μέγεθος του όγκου. Οι περισσότεροι συγγραφείς θεωρούν ότι το μέγεθος του όγκου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 με 2cm, ενώ άλλοι θεωρούν πρώιμο καρκίνο και όταν έχει μεγαλύτερη διάμετρο.

Επίσης τα in situ πορογενή ή λοβιακά καρκινώματα θεωρούνται πρώιμοι καρκίνοι αν και τελευταία από πολλούς συγγραφείς υπάρχουν αμφιβολίες για το αν πρέπει να θεωρούνται καρκίνοι. Πολλοί προτείνουν να τα θεωρούμε ως προκαρκινικές καταστάσεις ή και να τα θεωρήσουμε ως μια άλλη νοσολογική οντότητα⁴.

Με ποιούς τρόπους θα πρέπει να γίνεται η διάγνωση του πρώιμου καρκίνου του μαστού; Βασικό ρόλο η προληπτική μαστογραφία (απλή ή ψηφιακή) που πρέπει να γίνεται κάθε

1 ή 2 έτη, από την ηλικία των 40 ετών. Στον γυναικείο πληθυσμό που μπορεί να χαρακτηριστεί υψηλού κινδύνου πρέπει να αρχίζει αρκετά νωρίτερα.

Σε ποια ηλικία θα πρέπει να σταματά η προληπτική μαστογραφία δεν έχει τεκμηριωθεί, πολλοί όμως συγγραφείς θέτουν τα 75 ως τελική ηλικία⁵.

Ο υπερηχογραφικός έλεγχος είναι πάντοτε συμπληρωματικός της μαστογραφίας και έχει συγκεκριμένες ενδείξεις. Η αξία της είναι μεγάλη στις γυναίκες νεώτερες των 40 ετών όπου η μαστογραφία συνήθως δεν συνιστάται, μπορεί να είναι συμπληρωματική της μαστογραφίας, αναδεικνύει καλύτερα και ευκολότερα τις κύστες, μια δε εφαρμογή της είναι η ελαστογραφία που μας δείχνει την σκληρότητα της βλάβης, τα λεγόμενα birads (από 1 έως 5). Όσο τα birads μεγαλώνουν (από 3 και πάνω) τόσο η ανάγκη βιοψίας ή εκτομής γίνεται επιτακτική⁶.

Η μαγνητική μαστογραφία είναι ένα βασικό εργαλείο για την διαφορετική διάγνωση μιας βλάβης όπου η μαστογραφία ή ο υπέρηχος δεν μπορούν να καθορίσουν το είδος αυτής.

Επίσης έχει απόλυτη ένδειξη σε ασθενείς φορείς μετάλλαξης του ογκογονιδίου BRCA1 ή BRCA2, σε ασθενείς με ισχυρούς οικογενειακούς επιβαρυντικούς παράγοντες και γενικά στο γυναικείο πληθυσμό που έχει πιθανότητα προσβολής από καρκίνο μεγαλύτερο του 20%⁷.

Υπάρχουν ακόμη μια πληθώρα εξετάσεων που έχουμε την δυνατότητα να κάνουμε και η κάθε μια από αυτές έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και ενδείξεις. Θα αναφερθώ σε μερικές από αυτές:

α) Τομοσύνθεση μαστού: είναι μια τρισδιάστατη ακτινογραφική μέθοδος, οι τομείς της οποίας είναι μικρές (1mm). Είναι συμπληρωματική της μαστογραφίας με ένδειξη τους πυκνούς μαστούς και τις γυναίκες κάτω των 50 ετών.

β) Τρισδιάστατη υπέρηχοι: πάντοτε συμπληρωματικοί της μαστογραφίας κυρίως σε γυναίκες με πυκνούς μαστούς, σε μη ψηλαφητές βλάβες και σε εγκύους.

γ) Ελαστογραφία: συμπληρώνει τον υπέρηχο και μετρά την σκληρότητα της βλάβης. Όσο μεγαλύτερη είναι η σκληρότητα τόσο οι πιθανότητες κακοήθειας αυξάνονται.

δ) Αυτοεξέταση: έχει δοθεί μεγάλη σημασία και αξία στην αυτοεξέταση για την ανίχνευση πρώιμων καρκίνων του μαστού και στην

τελική μείωση της θνητότητας. Από μεγάλες όμως μελέτες (Ρωσία – Κίνα – Καναδάς) που περιλαμβάνουν δεκάδες χιλιάδες γυναίκες δεν αποδεικνύεται κάποια ιδιαίτερη αξία και όφελος στις γυναίκες που την εξασκούν συστηματικά.

Ιστολογική επιβεβαίωση

Τι πρέπει όμως να γίνει όταν οι διαγνωστικές εξετάσεις θέτουν την υποψία μιας πιθανής καρκινικής επεξεργασίας;

Πρέπει να γίνει ιστολογική – κυτταρολογική επιβεβαίωση πριν οδηγηθεί η γυναίκα στο χειρουργείο. Να τονισθεί ότι με όλες τις διαγνωστικές μεθόδους που διαθέτουμε σήμερα ανιχνεύουμε πολύ συχνά βλάβες μη ψηλαφητές. Και αυτό είναι ένα πρόβλημα γιατί οι βλάβες σε ένα ποσοστό που φθάνει έως και το 80% είναι καλοήθεις και δεν χρειάζονται εξαίρεση. Γι'αυτό πρέπει να υπάρχει ιστολογική επιβεβαίωση όντως ώστε να μην οδηγούνται στο χειρουργείο για μια καλοήγη πάθηση.

Η κυριότερη τεχνική λήψης κυττάρων ή ιστών είναι η FNA δηλαδή η λήψη κυττάρων με λεπτή βελόνη. Μπορεί να γίνει και υπό καθοδήγηση υπέρηχων, ιδίως σε μη ψηλαφητές βλάβες. Έχει όμως διάφορα μειονεκτήματα, όπως τα υψηλά ποσοστά ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων και η μη ικανότητα διαχωρισμού των διηθητικών καρκίνων από τα in situ⁸.

Για τον λόγο αυτό έχει διαδοθεί η λεγόμενη large-core needle biopsy. Χρησιμοποιεί βελόνη 14G και λαμβάνει υλικό για ιστολογική και όχι μόνο για κυτταρολογική. Η λήψη γίνεται με την χρήση αυτόματου καθοδηγούμενου πιστολιού και προσφέρει μεγάλη διαγνωστική ακρίβεια (ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα 1-7%)⁹.

Ακόμη καλύτερη τεχνική είναι η βιοψία με βελόνη μεγάλης διαμέτρου 11G και ταυτόχρονη αναρρόφηση του υλικού. Τα αποτελέσματα είναι άριστα. Πολλές φορές όταν η βλάβη είναι μικρή μπορεί να την αφαιρέσει όλη και σε μία πιθανή ανάγκη συμπληρωματικής εξαίρεσης δεν είναι δυνατή η εντόπιση της εξαιρεσθείσας περιοχής. Γι'αυτό σήμερα προτείνονται η τοποθέτηση clips στην περιοχή.

Ακολουθώντας όλες τις παραπάνω τεχνικές έχει καταστεί δυνατόν να οδηγούνται στο χειρουργείο μόνον οι γυναίκες που έχουν κακοήθεια και όχι καλοήγη νόσο.

Χειρουργική αντιμετώπιση του πρώιμου καρκίνου

Για πολλές δεκαετίες (έως τα μέσα της δεκαετίας του 1980) η τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή ήταν η χειρουργική τεχνική που χρησιμοποιούνταν για την αντιμετώπιση του πρώιμου καρκίνου του μαστού.

Το 1985 οι Veronesi και Fisher απέδειξαν ότι οι λιγότερο ακρωτηριαστικές επεμβάσεις (τεταρτεκτομή – ογκεκτομή) προσφέρουν τα ίδια αποτελέσματα όσον αφορά την επιβίωση και τον χρόνο ελεύθερης νόσου. Έτσι από τότε η τεχνική των επεμβάσεων αυτών επικράτησε και σήμερα όλοι οι χειρουργοί μαστού πρέπει να είναι λιγότερο επιθετικοί¹⁰.

Βέβαια είναι βασική ανάγκη η υποβολή του εναπομείναντα μαστού σε ακτινοθεραπεία ούτως ώστε να γίνει καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που πιθανόν να έχουν απομείνει στον μαστό¹¹.

Επειδή όμως η ακτινοβολία ολόκληρου του μαστού μπορεί να προκαλέσει διαφορά τοπικά προβλήματα από μερικά κέντρα σήμερα προτείνεται η μερική ακτινοβολία μόνον της πάσχουσας περιοχής. Ακόμη καλύτερη τεχνική θεωρείται η IORT (Intraoperative RT) και είναι η χορήγηση ακτινοθεραπείας στην χειρουργική αίθουσα αμέσως μετά την εξαίρεση του όγκου¹².

Χρησιμοποιείται ένα μηχάνημα Zeiss INTRABEAM που παράγει χαμηλής ενέργειας ακτίνες X που διαμέσου μιας κεφαλής διαχέεται στην κοιλότητα που έχει απομείνει μετά την αφαίρεση του όγκου. Η ακτινοβολία διαρκεί 20-45 λεπτά ανάλογα με το μέγεθος της κοιλότητας. Έχει τα ίδια αποτελέσματα με την ακτινοβολία ολόκληρου του μαστού, με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες και μικρότερο κόστος.

Ποια είναι όμως τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των δύο τεχνικών (ογκεκτομή – μαστεκτομή)¹³;

Θα πρέπει να επαναλάβουμε ότι και οι δύο τεχνικές προσφέρουν την ίδια επιβεβαίωση.

Επίσης φαίνεται ότι σε όγκους μεγαλύτερους των 2cm η ογκεκτομή δεν είναι η ενδεδειγμένη μέθοδος αν και από πολλές μελέτες προτείνεται η ογκεκτομή και σε όγκους μεγαλύτερου μεγέθους (έως και 4cm). Επιπλέον πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν και το μέγεθος του μαστού. Η ογκεκτομή σε έναν πολύ μικρό μαστό δεν έχει πάντοτε καλά κοσμητικά αποτελέσματα γιατί προκαλεί μεγάλη δυσμορφία και είναι προτιμότερη η

ριζική μαστεκτομή με πλαστική αποκατάσταση¹⁴.

Υπάρχουν υπέρ και κατά για κάθε μια από τις χειρουργικές τεχνικές. Υπέρ της ριζικής μαστεκτομής μπορούμε να πούμε τα κάτωθι:

α) Πρέπει να γίνεται σε όγκους μεγαλύτερους των 2cm ή κατ'άλλους σε όγκους μεγαλύτερους των 4cm

β) Αποφυγή της ακτινοθεραπείας και των επιπλοκών της

γ) Μείωση των τοπικών υποτροπών

δ) Ένδειξη απόλυτη στους πολυεστιακούς όγκους

ε) Σχετική ένδειξη στους κεντρικούς όγκους επειδή η ογκεκτομή προσφέρει άσχημα κοσμητικά αποτελέσματα

στ) Αδυναμία υποβολής ακτινοθεραπείας λόγω αποστάσεως, έλλειψης χρόνου

ζ) Η υψηλή συχνότητα καρκίνων του μαστού στην οικογένεια και η παρουσία τροποποιήσεων – μεταλλαγών στο BRCA1 και BRCA2 θέτουν την επιλογή της ριζικής μαστεκτομής.

Πρέπει όμως η επιλογή της τεχνικής να είναι πάντοτε υπόθεση της ίδιας της πασχούσης. Δεν πρέπει να ξεχνάμε την ψυχολογία της γυναίκας και πόσο αυτή δίνει σημασία στον μαστό της. Έτσι έχουμε γυναίκες που θεωρούν ότι μόνο η ογκεκτομή δεν τις προστατεύει και προτιμούν την ολική μαστεκτομή όπως έχουμε άλλες που επ' ουδενί τρόπο θέλουν να χάσουν τον μαστό τους και προτιμούν την ογκεκτομή.

Υπέρ των συντηρητικών χειρουργικών επεμβάσεων συνηγορούν πολλά πλεονεκτήματα. Κατ' αρχάς δεν είναι μια ακρωτηριαστική επέμβαση, η γυναίκα διατηρεί τον μαστό της και η ψυχολογία της παραμένει καλή¹⁵.

Πραγματικά η απουσία του μαστού είναι ένα μεγάλο πλήγμα για μια γυναίκα ασχέτως ηλικίας. Με την ογκεκτομή η γυναίκα μπορεί να εξέλθει του νοσοκομείου την ίδια ημέρα, έχει λιγότερες τοπικές επιπλοκές (αιματώματα, οιδήματα, διαποιήσεις), δεν φέρει σωλήνα παροχέτευσης, έχει πολύ λιγότερο μετεχειρητικό πόνο. Πρέπει όμως να έχουμε υγιή όρια εκτομής του όγκου και υπάρχει υγιής ιστός πέριξ αυτού σε απόσταση τουλάχιστον 5cm. Επίσης πρέπει να παρακολουθείται ο εναπομείναντας μαστός γιατί τα ποσοστά επανεμφάνισης καρκίνου στον χειρουργηθέντα μαστό είναι τουλάχιστον 10%.

Μη χειρουργικές τεχνικές εξαίρεσης πρώιμου καρκίνου

Επειδή και οι ήσσονος σημασίας χειρουργικές επεμβάσεις στον μαστό είναι ένα πρόβλημα και μια έντονη ιατρική παρέμβαση από διαφορά κέντρα προτείνονται μέθοδοι εκτομής ή καταστροφής του όγκου χωρίς χειρουργική επέμβαση. Θα αναφέρω μερικές από τις προτεινόμενες μεθόδους και πρέπει να τονίσω ότι ακόμη χρειάζεται διεξοδικότερη έρευνα και παρακολούθηση για να αποδειχθεί η απόλυτη αξιοπιστία τους.

1) Διαδερμική στερεοτακτική αφαίρεση:

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα όπως το ABBI (Advanced Breast Biopsy Instrumentation), ο μαμοτόμος, το Vacuum assistant core – sampling, τα οποία εύκολα αφαιρούν μικρούς όγκους (έως 1εκ.) υπό τοπική αναισθησία.

Το πρόβλημα όμως που πρέπει να απαντηθεί είναι αν η εκτομή του όγκου έχει γίνει σε υγιή όρια¹⁶.

2) Ραδιοσυχνότητες (RFA)

Τα καρκινικά κύτταρα, όπως εξάλλου όλα τα κύτταρα, είναι ευαίσθητα στις πολύ υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες. Με την τεχνική των ραδιοσυχνωτήτων ένας ηχοβολέας 15G που φέρει τα ηλεκτρόδια του μηχανήματος τοποθετείται στο κύτταρο του όγκου και χορηγείται εναλλασσόμενο ηλεκτρικό ρεύμα 400-500 KHz το οποίο αναπτύσσει θερμοκρασία. Η ανάπτυξη θερμοκρασίας 95°C προκαλεί κυτταρική νεύρωση και έτσι επιτυγχάνεται η καταστροφή του καρκίνου. Χρειάζεται 5 λεπτά για να επιτύχουμε θερμοκρασία 95°C και απαιτείται θέρμανση του όγκου για 15 λεπτά για να προκληθεί νεύρωση αυτού. Έχει την δυνατότητα καταστροφής όγκων έως και 3 cm¹⁷.

3) Καταστροφή του όγκου με υπερήχους

Χρησιμοποιώντας υπερήχους συχνότητας 1,5 MHz επιτυγχάνουμε θερμοκρασίες άνω των 90°C. Έτσι με εντοπισμό υπό υπερήχους του όγκου κατευθύνονται τα κύματα υπερήχων στον όγκο. Επιτυγχάνεται θερμοκρασία 90°C και καταστρέφονται τα καρκινικά κύτταρα. Ο χρόνος εφαρμογής πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 λεπτά. Η τεχνική αυτή έχει διάφορες τοπικές επιπλοκές όπως

οίδημα και δερματικές αντιδράσεις. Είναι ακόμη υπό μελέτη.

4) **Καταστροφή του όγκου με laser**

Αφού τοποθετηθεί ένα probe στο κέντρο της βλάβης, πάντοτε υπό καθοδήγηση υπερήχων εισέρχεται η ίνα που χορηγεί Laser. Η θερμοκρασία που επιτυγχάνεται είναι μεταξύ 80°C και 100°C, απαιτείται χορήγηση για 15-20 λεπτά και απ'ότι φαίνεται από πολλές μελέτες προκαλεί πλήρη καταστροφή του όγκου. Φαίνεται ότι είναι μια μέθοδος που θα έχει μεγάλη εφαρμογή στο μέλλον.

5) **Κρυοθεραπεία**

Τα καρκινικά κύτταρα όπως είναι ευαίσθητα στις υψηλές θερμοκρασίες έτσι είναι και στις χαμηλές. Στην κρυοθεραπεία χρησιμοποιείται ένα

σύστημα ψύξης με Argon ή με Nitrogen και ένα σύστημα θέρμανσης με Ήλιο. Μια probe τοποθετείται στο κέντρο του όγκου και δια μέσου αυτής ενεργοποιείται η χορήγηση ψύξης – θέρμανσης. Η θερμοκρασία εναλλάσσεται από τους -185°C στους +70°C. Το πρόβλημα με το σύστημα αυτό είναι ότι προκαλεί καταστροφή υγιών ιστών αρκετά πέριξ του όγκου.

Όλες οι ανωτέρω εναλλακτικές μέθοδοι αντιμετώπισης των καρκίνων μαστού πρώιμου σταδίου χρειάζονται ακόμη πολύ μελέτη και τροποποιήσεις. Είναι όμως πιθανό ότι στο μέλλον θα αντικαταστήσουν τις χειρουργικές πρακτικές τουλάχιστον σε μερικές υποκατηγορίες των πρώιμων καρκίνων του μαστού.

REFERENCES

- Breast cancer. Treatment option. Cancer net 27/01/2018 pp 1-14
- Lumpectomy versus Mastectomy for early-stage breast cancer. Cancer commons www.cancercommons.org, www.cancer.com
- S Zervoudis, G Iatrakis, F Tomara et al. Main controversies in breast cancer. World Journal of Clinical Oncology 2016, pp 1-13
- Harris and Morrow M. Clinical dilemma of ductal carcinoma in situ. J. Clin. Oncol 2009 DOI:10.120/JCO 2009 24.1489
- Gheonea I, Paluca P, Luana L et al. The rule of imaging techniques in diagnosis of breast cancer. Current Health Sciences Journal 2017, 43: 132-141
- Degner D, Helsey G, Hadgiandreou N et al. Breast lesion: evaluation with US imaging. Clinical experience of multiple observers. Radiology 2006, 238: 425-437
- Krege M, Brekelmans C, Boctes C et al. Efficiency of MRI and mammography for breast cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. N Engl J Med 2004 351: 427-437
- Holloway C, Gagliardi A. Percutaneous needle biopsy for breast cancer diagnosis. Ann Surg Omol 2009; 16: 1629-1636
- Vencataraman S, Dialani V. Stereotactic core biopsy. Comparison of 11 gauge with 8 gauge vacuum assisted breast biopsy. Eur J Radiol 2011, 81:2613-2619
- Surgery choice for women with early-stage breast cancer. U.S. Department of health and human services. <https://info.ahrq.gov>, 21/01/2018
- Buchholz T, Strom M, Perkins H et al. Controversies regarding the use of radiation after mastectomy in breast cancer. The oncologist 2002, 7: 539-546
- J Christenbury. New treatment for early-stage breast cancer offers surgery and one-time radiation treatment while in operating room. Emory news center 2017
- Livingstone E, Li H. Breast cancer surgery. Less is more. JAMA 2017, 10:909-911
- Fisher et al. Twenty-year follow up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy and lumpectomy plus radiation. N.E.J. of med. 2002, 16:1233-1241
- Johantgen M, Coffey R, Harris R. Treating early-stage breast cancer. Hospital characteristics associated with breast-conserving surgery. American Journal of public health 1995, 85: 1434-1438
- Morrow M. Minimally invasive surgery for breast cancer. B.M.S. 2009, 338-351
- Shassburger K, Löfgren L, Lagersteadt U et al. Minimally invasive treatment of early-stage breast cancer. A feasibility study using radio frequency ablation under local anesthesia. The breast 2014, 23:152-158

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

Είδη εργασιών

Στο «Καρκίνου Πρόληψις - Cancer Prevention» γίνονται δεκτές εργασίες με θέματα ογκολογικού ενδιαφέροντος υπό την εξής μορφή:

Πρωτότυπων εργασιών βασικής ή κλινικής έρευνας, ή επιδημιολογικού χαρακτήρα. Οι εργασίες δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τις 4.000 λέξεις κυρίως κειμένου.

Ανασκοπήσεων σε έκταση που να μη ξεπερνά τις 6.000 λέξεις κυρίως κειμένου.

Ενδιαφερόντων περιστατικών για σύντομη (1-3 σελίδες) παρουσίαση σπάνιας νόσου, εκδήλωσης, ασυνήθους κλινικής πορείας ή περιπτώσεων με ενδιαφέρον από άποψη διαγνωστικής προσπέλασης.

Ειδικά θέματα γενικού ογκολογικού ενδιαφέροντος, εργασίες που δεν κατατάσσονται σε άλλη κατηγορία εργασιών, έκτασης μέχρι 5.000 λέξεις κυρίως κειμένου.

Γράμματα αναγνωστών έκτασης 500 λέξεων, με κρίσεις για δημοσιευμένη εργασία ή γενικότερες γνώμες, σύντομες παρατηρήσεις, πρόδρομα αποτελέσματα σε συντομία, κ.λ.π.

Πρακτικά σεμιναρίων, συμποσίων, στρογγυλών τραπεζιών, κατά την κρίση της Σύνταξης.

Η Συντακτική Επιτροπή αποδέχεται και μεταδημοσιεύει εργασίες υπό τη μορφή σύντομων αναφορών, έκτασης έως 2.500 λέξεων κυρίως κειμένου, με την ανάλογη δομή. Στη περίπτωση αυτή, αναφέρεται υποχρεωτικώς, στη σελίδα του τίτλου, το περιοδικό που πρωτοδημοσιεύτηκε η πρωτότυπη εργασία.

Υποβολή εργασίας

Οι εργασίες υποβάλλονται ηλεκτρονικά με e-mail σε αρχείο Word στην ηλεκτρονική διεύθυνση: drginop@otenet.gr. Σε συνοδευτική σελίδα, αναγράφεται ο υπεύθυνος της αλληλογραφίας και τα πλήρη στοιχεία του (δ/νση, τηλέφωνο, φαξ, email). Η υποβολή εργασίας δεν συνεπάγεται και δημοσίευσή της. Τα πλήρη στοιχεία επικοινωνίας για οποιαδήποτε ενημέρωση είναι: Ελληνική Εταιρεία Προληπτικής Ογκολογίας, Ηρώων Πολυτεχνείου 104 & Τερτσέτη, Πάτρα, ΤΚ 26442, τηλ/φαξ: 2610-431465, www.cancerprevention.gr

Δομή εργασίας

Η γλώσσα των εργασιών είναι η Ελληνική, η Αγγλική και η Ιταλική. Το κείμενο της εργασίας θα πρέπει να είναι γραμμένο με γραμματοσειρά Times New Roman σε μέγεθος χαρακτήρων 12pt, σε διπλό διάστημα με αρίθμηση σελίδων.

Το χειρόγραφο πρέπει να έχει:

1. **Σελίδα τίτλου**, η οποία περιλαμβάνει τον τίτλο της εργασίας, τα ονόματα των συγγραφέων (το αρχικό γράμμα του ονόματος ακολουθούμενο από το επώνυμο) και την ιδιότητά τους, το τμήμα από το οποίο προέρχεται η εργασία (Τμήμα/κλινική/εργαστήριο, νοσοκομείο/ ίδρυμα, πόλη, χώρα), και ένα βραχύ τίτλο της εργασίας. Αν πρόκειται για περισσότερα του ενός τμήματα, σημειώνεται, με

αριθμητικές ενδείξεις, σε ποιο από αυτά ανήκει ο κάθε συγγραφέας. Οι πληροφορίες γράφονται στα ελληνικά και στα αγγλικά.

2. **Περίληψη και λέξεις κλειδιά** (keywords). Σύντομη παρουσίαση της εργασίας έως 250 λέξεις δομημένη σε διακριτά μέρη ανάλογα με το είδος της εργασίας. Στο τέλος της περίληψης θα πρέπει να αναγράφονται 3-7 λέξεις-κλειδιά. Οι πληροφορίες γράφονται στα ελληνικά και στα αγγλικά.

3. **Κυρίως κείμενο**, ανάλογα με τον τύπο της εργασίας: πρωτότυπη εργασία: εισαγωγή, σκοπό, υλικό-μέθοδο, αποτελέσματα, συζήτηση-συμπεράσματα, ενδιαφέρον περιστατικό: εισαγωγή, περιγραφή περιστατικού και συζήτηση. Σε περίπτωση ανασκόπησης, η εργασία θα χωρίζεται σε κεφάλαια με αντίστοιχους τίτλους ανάλογα με το θέμα και κατά την κρίση των συγγραφέων.

4. **Βιβλιογραφίες**, οι οποίες μέσα στο κείμενο αναγράφονται με διαδοχική σειρά με αραβική αρίθμηση υπό μορφή εκθέτη. Ο κατάλογος των βιβλιογραφιών συντάσσεται με αριθμητική σειρά σύμφωνα με τη σειρά εμφάνισής τους στο κείμενο. Για άρθρα περιοδικών αναγράφονται τα επώνυμα των συγγραφέων ακολουθούμενα από τα αρχικά των ονομάτων χωρίς τελείες (Byrne TA), ο τίτλος του άρθρου, το περιοδικό (αναγραφή σύντμησης με βάση το Index Medicus), η χρονολογία, ο αριθμός τόμου και οι σελίδες του άρθρου. Αναγράφονται όλοι συγγραφείς όταν είναι τρεις ή λιγότεροι. Σε αντίθετη περίπτωση, αναγράφονται οι τρεις πρώτοι ακολουθούμενοι από τις λέξεις «et al» ή «και συν».

5. **Πίνακες και εικόνες**, τα οποία αναγράφονται σε ξεχωριστή σελίδα το καθένα. Οι πίνακες αριθμούνται διαδοχικά με αραβικούς αριθμούς και έχουν βραχύ εξηγηματικό τίτλο του περιεχομένου τους στο άνω μέρος. Όλα τα διαγράμματα, σχήματα, κ.λ.π. φέρονται στις εργασίες ως εικόνες και αριθμούνται διαδοχικά με αραβικούς αριθμούς. Όλες οι εικόνες πρέπει να έχουν βραχύ τίτλο και τις απαραίτητες εξηγήσεις. Το μέγεθος των εικόνων στη τελική εκτύπωση ανήκει στην κρίση του υπεύθυνου έκδοσης.

Άλλες πληροφορίες

- Η Σύνταξη του περιοδικού θεωρεί δεδομένο, ότι η εργασία είναι σε γνώση και έχει την έγκριση όλων των συγγραφέων και του διευθυντού του τμήματος από το οποίο προέρχεται
- Οι προς δημοσίευση εργασίες υποβάλλονται σε κρίση από δύο κριτές.
- Οι εργασίες που δημοσιεύονται στο περιοδικό, αποτελούν πνευματική ιδιοκτησία του συγγραφέα και του περιοδικού. Η αναδημοσίευση, μερική ή ολική, επιτρέπεται μόνον ύστερα από έγγραφη άδεια της Συντακτικής Επιτροπής. Η δημοσίευση μιας εργασίας δεν συνεπάγεται αποδοχή των απόψεων των συγγραφέων από πλευράς της ΕΕΠΟ, η οποία δεν ευθύνεται για το περιεχόμενο των δημοσιευμένων άρθρων.

Χορηγοί



