ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΣΑΣ

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ—ΤΜΗΜΑ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

Καθηγητής / Διευθυντής: Δ. Αρβανίτης

**Η ανίχνευση των Πρωτεϊνών Θερμικού Σοκ 70 και της
p53 στα σαρκώματα Ewing και η κλινική τους
συσχέτιση με την πρόγνωση της νόσου**

Στέφανος Π. Λαζαρίδης
Χειρουργός Ορθοπαιδικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΑΡΟΧΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.:	7736/1
Ημερ. Εισ.:	14-11-2009
Δωρεά:	Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός:	Δ
	572.6
	ΛΑΖ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

004000083789

✓

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΣΑΣ

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ—ΤΜΗΜΑ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

Καθηγητής / Διευθυντής: Δ. Αρβανίτης

**Η ανίχνευση των Πρωτεϊνών Θερμικού Σοκ 70 και της
p53 στα σαρκώματα Ewing και η κλινική τους
συσχέτιση με την πρόγνωση της νόσου**

Στέφανος Π. Λαζαρίδης
Χειρουργός Ορθοπαιδικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΣΑ 2003

“ Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα ” (Νόμος 5343/32, άρθρο 200, παρ. 2).

Στους γονείς μου

Περιεχόμενα:

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

	Σελίδα
Εισαγωγή.....	1
ΤΟ ΣΑΡΚΩΜΑ EWING.....	3
Ορισμός.....	3
Επιδημιολογία.....	3
Κύτταρο καταγωγής – Οικογένεια όγκων Ewing.....	4
Μοριακή Βιολογία.....	5
Κλινική εικόνα.....	9
Ακτινολογικά ευρήματα.....	10
Σπινθηρογράφημα οστών.....	13
Αγγειογραφία.....	14
Αξονική Τομογραφία.....	14
Μαγνητική Τομογραφία.....	14
Διάγνωση.....	16
Βιοψία.....	16
Μακροσκοπικά ευρήματα.....	17
Μικροσκοπικά ευρήματα.....	18
Ανοσοϊστοχημεία.....	20
Κυτταρογενετική και Μοριακή Βιολογία.....	21
Διαφορική Διάγνωση.....	22
Πρόγνωση.....	23
Θεραπεία.....	25
Χημειοθεραπεία – Έλεγχος της συστηματικής νόσου.....	25
Έλεγχος τοπικής νόσου.....	28
Ακτινοθεραπεία.....	29
Χειρουργική Θεραπεία.....	30
Λεκάνη.....	31
Εγγύς μηριαίο.....	31
Σπονδυλική Στήλη.....	32

Μεταστατικό Σάρκωμα Ewing.....	32
Προγνωστικοί Δείκτες.....	33
Υποτροπιάζουσα νόσος σαρκώματος Ewing.....	33
Νέοι ορίζοντες θεραπείας.....	35

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Απόπτωση.....	38
Εισαγωγή.....	38
Μορφολογία Απόπτωσης.....	38
Η βιοχημεία της Απόπτωσης.....	39
Γονίδια εμπλεκόμενα στο μηχανισμό της απόπτωσης.....	40
Χημειοθεραπεία και απόπτωση.....	41
Ακτινοθεραπεία και απόπτωση.....	41
Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	42
 Οι Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ 70 (Heat Shock Proteins 70).....	 44
Γενικά.....	44
Χαρακτηριστικά και λειτουργία των HSP70.....	44
Ο ρόλος των HSP70 στη διαδικασία της απόπτωσης.....	45
 Η p53.....	 49
Εισαγωγή – Τα ογκογονίδια.....	49
Το ογκογονίδιο p53.....	49
Η δράση της Πρωτεΐνης p53.....	51
Μεταλλάξεις της p53 στο σάρκωμα Ewing.....	53
Ο ρόλος της p53 στη θεραπεία του καρκίνου-Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	54
Επιδιόρθωση της λειτουργίας της p53.....	54
Αποπτωτικές οδοί που δεν συμπεριλαμβάνουν την p53.....	55
Άλλες στρατηγικές θεραπείας.....	55

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 57

Εισαγωγή.....	58
Ασθενείς και Μέθοδος.....	60
Πειραματικό μέρος.....	65

Η ανοσοιστοχημική ανίχνευση της HSP 70.....	65
Η ανοσοιστοχημική ανίχνευση της p53.....	66
Αποτελέσματα.....	67
Συζήτηση.....	70
Συμπεράσματα.....	75
Περίληψη.....	77
Abstract.....	78
Βιβλιογραφία.....	79
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	99

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή της Παθολογοανατομικής και Ανατομίας, κ. Δημήτριο Αρβανίτη, για την ανάθεση του θέματος και την ακούραστη επιστημονική καθοδήγηση όλης της δουλειάς μου.

Τον καθηγητή Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, κ. Γεώργιο Αντωνακόπουλο, ευχαριστώ ιδιαίτερα για την επιστημονική υποστήριξή του, προκειμένου να ολοκληρωθεί η εργασία μου.

Τον Διευθυντή της Παιδιατρικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παίδων “Αγία Σοφία”, κ. Σταύρο Χαιδά, και την Καθηγήτρια Αιματολογίας κα.Φωτεινή Τζωρτζάτου, ευχαριστώ θερμά για τη συναίνεσή τους να μελετήσω τα ιστορικά των ασθενών που νοσηλεύτηκαν στις κλινικές τους, προκειμένου να ολοκληρώσω επιτυχώς την έρευνά μου.

Τη Λέκτορα Παθολογοανατομικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Θεσσαλίας, κα. Ιωάννου Μαρία ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη βοήθειά της προκειμένου να ολοκληρωθεί η ανοσοιστοχημική μελέτη των παρασκευασμάτων.

Το προσωπικό των εργαστηρίων του “Χωρέμειου Ιδρύματος” ευχαριστώ επίσης για τη βοήθειά του στην αναζήτηση των περιστατικών.

Τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων επιμελήθηκε η Κα. Ουρανία Αγγελίδου, την οποία ευχαριστώ θερμά.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1921, ο James Ewing περιέγραψε ένα κακοήθη, μη-οστεογενή, πρωτοπαθή όγκο των οστών, χαρακτηριζόμενο από νησίδια από αναπλαστικά, μικρά, στρόγγυλα κύτταρα στενά συσχετιζόμενα με αιματικά αγγεία. Τον όγκο αυτό ονόμασε *διάχυτο ενδοθηλίωμα των οστών ή ενδοθηλιομυέλωμα των οστών*[1]. Το πρώτο περιστατικό που ανέφερε αφορούσε ένα κοριτσάκι 14 ετών με μια λυτική εστία στην ωλένη που ανταποκρίθηκε δραματικά στην ακτινοθεραπεία.

Ο Ewing παρατήρησε πως ο όγκος αυτός διέφερε από το οστεογενές σάρκωμα στο ότι αποτελούνταν από μικρά, στρόγγυλα κύτταρα παρά από μεγάλα ατρακτοειδή κύτταρα όπως το δεύτερο. Μια άλλη σημαντική διαφορά ήταν πως ο «νέος» όγκος ήταν ακτινοευαίσθητος, σε αντίθεση με το οστεογενές σάρκωμα και συχνά εξορμούσαν από τη διάφυση του οστού χωρίς να επηρεάζει τις επιφύσεις όπου το οστεοσάρκωμα ήταν συχνότερο.

Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί στη θεραπεία του σαρκώματος Ewing τα τελευταία 30 χρόνια. Η είσοδος της χημειοθεραπείας και η εξέλιξη της μέσα στο χρόνο κατάφερε να εξολοθρεύσει τις απομακρυσμένες μεταστάσεις και να αυξήσει την 5-ετή επιβίωση από 5-10% (20 χρόνια πριν), σε 70% περίπου που υπολογίζεται σήμερα [2].

Το 1967, ο Boyer[3] υποστήριζε πως επειδή η πλειονότητα των βλαβών μπορούσε να ελεγχθεί τοπικά με τη χρήση ακτινοθεραπείας και επειδή το 90% των ασθενών θα υπέκυπτε ούτως ή άλλως λόγω διασποράς της νόσου, το μείζον τραύμα του ακρωτηριασμού θα έπρεπε να αποφευχθεί. Η χειρουργική συμμετοχή στην αντιμετώπιση του όγκου έπεσε σε δυσμένεια.

Το 1969, οι Johnson και Humphreys [4] προσέθεσαν το χημειοθεραπευτικό παράγοντα κυκλοφωσφαμίδη σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία για τον πρωτοπαθή όγκο και ανέφεραν παρατεταμένη ελεύθερη συμπτωμάτων επιβίωση. Η μελέτη αυτή οδήγησε κι άλλους ερευνητές να συνδυάσουν διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες γνωστούς για τη δραστικότητά τους κατά του σαρκώματος Ewing [5]. Ο Rosen et al.[6], το 1973, ανέφερε θεαματικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό κατ' ακολουθία της Vincristin, Actinomycin D, Cyclophosphamide και Doxorubicin στη χημειοθεραπεία του σαρκώματος. Οι παραπάνω παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν σε ταυτόχρονο χημειοθεραπευτικό συνδυασμό από το 1975 με σκοπό να επιτευχθεί ακόμη μεγαλύτερη δραστικότητα κατά του πρωτοπαθή όγκου και των απομακρυσμένων μεταστάσεων [7].

Το 1981, το πρώτο Intergroup Ewing's Sarcoma Study (IESS-I, 1973-1978) απέδειξε ότι η προσθήκη Doxorubicin στο συνδυασμό των τριών παραγόντων Vincristin, Actinomycin D και Cyclophosphamide βελτίωνε την επιβίωση των ασθενών [7,8].

Το 1986, το δεύτερο Intergroup Ewing's Sarcoma Study (IESS-II, 1978-1982) ανέφερε 73% 5-ετή επιβίωση χωρίς υποτροπή, για μη-μεταστατικούς πρωτοπαθείς όγκους εκτός της πυέλου, που αντιμετωπίστηκαν με το παραπάνω συνδυασμό φαρμάκων. Η μελέτη αυτή απέδειξε την ανωτερότητα της χρήσης υψηλών παρά μέσων δόσεων των ανωτέρω χημειοθεραπευτικών παραγόντων όσον αφορά την ελεύθερη νόσου και συνολική επιβίωση [9].

Με την παράταση της επιβίωσης των ασθενών μετά τη χρήση των νέων χημειοθεραπευτικών μέσων, επιπλοκές όπως η καθυστερημένη τοπική υποτροπή, η απώτερη λειτουργική ανεπάρκεια του μέλους και η δευτερογενής ανάπτυξη σαρκωμάτων λόγω της ακτινοθεραπείας, ήρθαν στην επιφάνεια [2,10] ευνοώντας την επαναφορά της εκλεκτικής χειρουργικής θεραπείας στην αντιμετώπιση του όγκου [11].

Η ανάπτυξη μοντέρνων τεχνικών για διατήρηση του μέλους με τη βοήθεια της αξονικής και μαγνητικής τομογραφίας διευκόλυνε αυτή την προσέγγιση.

Νέες μελέτες ανά τον κόσμο, χρησιμοποιώντας νέους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η ετοποσίδη και η ιφωσφαμίδη [12] και νέα σχήματα θεραπείας, τη χρήση προ-εγχειρητικής (neo-adjuvant) χημειοθεραπείας[13], την μεταμόσχευση μυελού των οστών ή αρχέγονων περιφερικών κυττάρων του αίματος [14,15] σε συνδυασμό με υψηλές δόσεις χημειοθεραπευτικών παραγόντων καθώς και η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας [16], ευελπιστούν για περαιτέρω βελτίωση της πρόγνωσης του συχνού αυτού νεοπλασματος της παιδικής ηλικίας.

ΤΟ ΣΑΡΚΩΜΑ EWING

Ορισμός

Το σάρκωμα Ewing είναι ένας ευκρινής όγκος που αποτελείται από μικρά, στρόγγυλα κύτταρα και εντοπίζεται συνήθως στα μακρά οστά, σκελετικά ανώριμων ασθενών. Ο όγκος αποτελείται από αδιαφοροποίητα, στρόγγυλα, μεσεγχυματικά κύτταρα που είναι πλούσια σε γλυκογόνο και εμφανίζουν μια ανωμαλία του καρυοτύπου τους που προέρχεται από την ανταλλαγή των δεσμών q24 και q12, μεταξύ των χρωμοσωμάτων 11 και 22 αντίστοιχα [reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12)], που οδηγεί στην έκφραση μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης, της EWS/FLI-1 πρωτεΐνης. Αυτή η γενετική ανωμαλία εντοπίζεται στο 90% των σαρκωμάτων Ewing[17].

Επιδημιολογία

Το σάρκωμα Ewing είναι ο δεύτερος πιο συχνός πρωτοπαθής κακοήθης όγκος της παιδικής ηλικίας και ο τέταρτος πιο συχνός όγκος των οστών συνολικά[18]. Αποτελεί το 6-8% όλων των πρωτοπαθών κακοήθων όγκων των οστών στο γενικό πληθυσμό. Ο μέσος ετήσιος επιπολασμός του όγκου είναι 0.6-0.8 για κάθε εκατομμύριο πληθυσμού και 2-3 για κάθε εκατομμύριο πληθυσμού κάτω των 21 ετών. Το 65% της νόσου εμφανίζεται στη δεύτερη δεκαετία της ζωής και είναι εξαιρετικά σπάνιο μετά το 30^ο και πριν το 5^ο έτος της ηλικίας. Παρόλα αυτά μπορεί να εμφανιστεί σε κάθε ηλικία και ο νεώτερος ασθενής που έχει αναφερθεί ήταν 5 μηνών ενώ ο πιο ηλικιωμένος 83 ετών[18,19,20,21]. Υπάρχει μια υπεροχή του ανδρικού πληθυσμού έναντι του γυναικείου με αναλογία 3:2. Το σάρκωμα Ewing είναι εξαιρετικά σπάνιο στη μαύρη φυλή με συχνότητα περίπου 2% του συνόλου. Σπάνιο είναι επίσης και στους Ασιάτες [22,23] ενώ δεν έχει αναφερθεί κληρονομικός παράγοντας [24].

Ο όγκος πιο συχνά εμφανίζεται στα μακρά οστά και στη λεκάνη. Όσον αφορά τα μακρά οστά συνήθως εντοπίζεται στη διάφυσή τους, παρόλο που οποιοδήποτε τμήμα ή και όλο το οστόν μπορεί να προσβληθεί. Η πιο συχνή του εντόπιση είναι η άπω μετάφυση και η διάφυση του μηριαίου και ακολουθούν η λεκάνη, η κνήμη, η περόνη, το βραχιόνιο, και λιγότερο συχνά οι πλευρές, η ωμοπλάτη, η σπονδυλική στήλη, το άκρο πόδι και το κρανίο [18,25]. Στα κάτω άκρα είναι συχνότερο απ'ότι στα άνω και αν κάποιος συμπεριλάβει και τη λεκάνη τότε τα 2/3 του όγκου εμφανίζονται στο άπω ημιμόριο του σώματος. Η εντόπιση του όγκου στη μεταδιάφυση (45%) είναι συχνότερη από ότι στη διάφυση (33%) των οστών, ενώ η εντόπιση στην μετάφυση (15%) και στη μεταεπίφυση (6%), είναι ακόμη πιο σπάνιες [25]. Η σκελετική κατανομή του όγκου όπως υπολογίστηκε από το συνδυασμό 466 περιστατικών από δύο μεγάλες σειρές[26], απεικονίζεται παρακάτω.(Εικόνα 1). Το μηριαίο φαίνεται να προσβάλλεται στο 23% των περιπτώσεων, η λεκάνη στο 17%, η κνήμη στο 10%, η περόνη στο 10%, το βραχιόνιο επίσης στο 10%, λιγότερο συχνά οι πλευρές στο 7%, ενώ άλλες περιοχές του σκελετού σπανίως.

Εικόνα 1. Σκελετική κατανομή του σαρκώματος Ewing. Συνδυασμός στοιχείων από δύο μεγάλες σειρές (συνολικά 466 περιπτώσεις).

Κύτταρο καταγωγής—Οικογένεια όγκων Ewing

Το 1921 ο Ewing υποστήριξε, πως ο όγκος που φέρει το όνομά του, κατάγονταν από το αγγειακό ενδοθήλιο [1]. Το ακριβές κύτταρο καταγωγής δεν έχει ακόμη εντοπισθεί, αλλά ανοσοϊστοχημικές μελέτες, μελέτες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και κυτταρογενετικές αναλύσεις από διάφορους ερευνητές, συνιστούν πως η καταγωγή του όγκου είναι πιθανότατα ο νευρικός ιστός. Οι ψευδοροζέτες που εντοπίζονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο νευροβλάστωμα και στον Περιφερικό Αρχέγονο Νευροεξωδερμικό Όγκο ή περιφερικό νευροεπιθηλίωμα, (Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumour, PPNET) εντοπίζονται και στο σάρκωμα Ewing κατά το 20% [27]. Επιπλέον, υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της μεταφοράς της ακετυλοχολίνης έχουν βρεθεί στο σάρκωμα Ewing και στο PPNET, ενώ η χρωμοσωμική δια-ανταλλαγή $t(11;22)(q24;q12)$ είναι κοινή και για τους δύο όγκους, που επίσης μοιράζονται μια όμοια πατέντα πρωτοογκογονιδιακής έκφρασης [28]. Ο Cavazzana και συν. [29] κατάφερε να πυροδοτήσει νευρική διαφοροποίηση σε κλασικό σάρκωμα Ewing με θεραπεία με c-AMP. Τα ευρήματα αυτά συνιστούν μια ισχυρή συσχέτιση, πιθανότατα και ένα κοινό κύτταρο καταγωγής, μεταξύ του Ewing και του PPNET των οστών. Βασικά το σάρκωμα Ewing μπορεί να είναι η αδιαφοροποίητη άκρη μιας σειράς όγκων των οστών με νευρική καταγωγή.

Η οικογένεια των όγκων με τους κοινούς χαρακτήρες που προαναφέρθηκαν, περιλαμβάνει το κλασικό σάρκωμα Ewing των οστών, το εξωοστικό ή Ewing των μαλακών μορίων, τον όγκο Askin του θωρακικού τοιχώματος και το PPNET των οστών και των μαλακών μορίων [30].

Μοριακή Βιολογία

Η μεταφορά ενός τμήματος χρωμοσώματος σε ένα άλλο χρωμόσωμα, μπορεί να φέρει σ'επαφή δύο γονίδια στο ίδιο σημείο. Το γεγονός αυτό με τη σειρά του μπορεί να προκαλέσει συνένωση (fusion) των δύο κωδικοποιητικών σειρών κοντά στο σημείο επαφής (breakpoint), δημιουργώντας ένα υβρίδιο αγγελιαφόρο RNA (mRNA) το οποίο κωδικοποιεί μια εντελώς νέα πρωτεΐνη που μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην κυτταρική βιολογία. Η διασαφήνιση των μοριακών δομών στα σημεία επαφής (breakpoints) και η αναγνώριση των γονιδίων που επηρεάζονται από τις δια-ανταλλαγές στα μικρά-στρογγυλοκυτταρικά σαρκώματα οδήγησε στην αναγνώριση χαρακτηριστικών λειτουργικών ομοιοτήτων. Φαίνεται ότι η πλειονότητα των δια-ανταλλαγών στην οικογένεια σαρκωμάτων Ewing, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός « αντιγράφου από συνένωση (fusion transcript) » που αποτελείται από δύο μέρη: α) ένα τμήμα γονιδίου το οποίο έχει μια περιοχή σύνδεσης με το RNA (γονίδιο EWS που δύναται να ενεργοποιήσει το RNA), που αντικαθίσταται με ένα β) άλλο τμήμα γονιδίου που δύναται να συνδεθεί με το DNA και να πυροδοτήσει την έναρξη της λειτουργίας της μετάφρασης (γονίδιο FLI-1, ERG, WT-1)[31,32,33,34]. Επιπλέον φαίνεται πως το γονίδιο EWS μπορεί και ενώνεται ανεξάρτητα με καθένα από τα ανωτέρω πυροδοτούντα τη μετάφραση του DNA γονίδια, οδηγώντας σε ξεχωριστές, ιδιαίτερες οντότητες «στρογγυλοκυτταρικών όγκων». Σχήμα 1 [35].

Η αμοιβαία δια-ανταλλαγή μεταξύ των χρωμοσωμάτων 11 και 22 που αφορά τις δέσμες q24 και q12 [t(11;22)(q24;q12)] αντίστοιχα, εμφανίζεται στη συντριπτική πλειοψηφία και απαντά στο 90% περίπου των σαρκωμάτων Ewing, PNET και Askin του θωρακικού τοιχώματος [36,37]. Η δια-ανταλλαγή t(11;22)(q24;q12) μπορεί να επιδειχθεί κυτταρογενετικά και πριν την κλωνοποίηση των χρωμοσωματικών καταγμάτων, αυτό αποτελούσε το μόνο στοιχείο για τη διάγνωση των Ewing ή των PNET. Μελέτες σε μοριακό επίπεδο απέδειξαν πως το «κάταγμα» του χρωμοσώματος 22 εμφανίζεται δια του γονιδίου EWS ενώ αυτό του χρωμοσώματος 11 δια του γονιδίου FLI-1[38,39].

Το γονίδιο EWS αποτελείται από 17 εξόνια (exons: coding sequences) και περιλαμβάνει 40 Κιλοβάσεις [40]. Στο 80% περίπου των περιπτώσεων τα σημεία κατάγματος (breakpoints) βρίσκονται μεταξύ των ιντρονίων (introns: non-coding sequences) 7 και 8. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός «χμαιρικού» μοντέλου αντιγραφής που περιλαμβάνει τα εξόνια 1-7 του γονιδίου EWS. Ανεξάρτητα από το σημείο διαχωρισμού, το εξόνιο 8 αποκλείεται πάντα από το μοντέλο αντιγραφής. Το γονίδιο FLI-1 είναι μέλος της οικογενείας ETS (Erythroblastosis virus-Transforming Sequence) των παραγόντων αντιγραφής του DNA [41]. Η συνένωση των δύο αυτών γονιδίων έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας υβριδικής πρωτεΐνης στην οποία το τμήμα του EWS γονιδίου που φυσιολογικά συνδέεται με το RNA έχει αντικατασταθεί με το τμήμα του γονιδίου FLI-1 που συνδέει το DNA. Σχήμα 2 [42].

Προκύπτει έτσι ένα νέο γονίδιο από συνένωση (fusion gene) το EWS/FLI1 το οποίο έχει αποδειχθεί ως δυνητικός μεταλλακτικός παράγοντας εάν μεταφερθεί σε κύτταρα ποντικού NIH3T3. Το γονίδιο FLI-1 μόνο του δεν έχει αυτή την ιδιότητα και απαιτούνται και τα δύο προκειμένου να δράσουν ογκογενετικά.

Έχει επιδειχθεί πως το γονίδιο EWS μπορεί να μεταφερθεί και να συνδεθεί και με άλλα γονίδια πέραν του FLI-1, δίνοντας γένεση σε άλλες χμαιρικές πρωτεΐνες (σχήμα 1). Η δεύτερη εναλλακτική κυτταρογενετική ανωμαλία είναι η αμοιβαία δια-ανταλλαγή t(21;22)(q22;q12) και απαντά στο 10% των όγκων της οικογενείας Ewing. Αυτή η δια-ανταλλαγή συνενώνει το 5'τμήμα του EWS από το χρωμόσωμα 22q12 στο γονίδιο ERG που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21q22 [43].

Η τρίτη εναλλακτική δια-ανταλλαγή παρούσα στα Ewing και στα PNET είναι η t(7;22)(p22;q12), η οποία ξανά συνενώνει το EWS αλλά αυτή τη φορά με το γονίδιο ETV-1, στο χρωμόσωμα 7p22 [44]. Λεπτομέρειες για τη μοριακή δομή και τη συχνότητα αυτής της ανωμαλίας στην οικογένεια των σ.Ewing δεν είναι ακόμη γνωστές. Άλλες δια-ανταλλαγές ακόμη πιο σπάνια απαντώμενες στην οικογένεια των σ.Ewing είναι η t(17;22)(q12;q12) και η t(2;22)(q33;q12), που οδηγούν αντίστοιχα στη δημιουργία των «χμαιοειδών γονιδίων από συνένωση», EWS/E1AF (E1A Factor) και EWS/FEV (Fifth Ewing Variant) αντίστοιχα [45,46].

Λειτουργία του χμαιοειδούς μορίου

A) Ρύθμιση της αντιγραφής

Οι απαντώμενες στο σ.Ewing/PNET δια-ανταλλαγές οδηγούν σε χμαιοειδή μόρια που περιέχουν το αμινοτελικό τμήμα του γονιδίου EWS, συνενωμένο με το συνδέον το νουκλειικό οξύ, τμήμα του παράγοντα αντιγραφής του εν λόγω μορίου. Αυτή η δομή σημαίνει πως η χμαιοειδής πρωτεΐνη κατευθύνεται προς γονίδια που αναγνωρίζονται από το συνδέον το DNA τμήμα της και συμμετέχει στην ογκογένεση μεταβάλλοντας την έκφραση των γονιδίων αυτών[47]. Δύο είναι οι προτεινόμενοι μηχανισμοί που τα χμαιοειδή μόρια μπορεί να συμμετέχουν στην ογκογένεση: 1) Το EWS-FLI1 μπορεί να επηρεάσει την αντιγραφή μερικών από τα γονίδια που φυσιολογικά ελέγχονται από το FLI1, αλλά επειδή το χμαιοειδές μόριο εκφράζεται με διαφορετικό ποιοτικό ή ποσοτικό τρόπο, οι αναχαιτιστικοί παράγοντες απορυθμίζονται επηρεάζοντας την αύξηση των κυττάρων, και 2) Το EWS-FLI1 μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά καθανά τα γονίδια—στόχους από ότι το FLI1 μόνο του, γεγονός το οποίο θα εξηγούσε γιατί η υπέρ-έκφραση του δεύτερου δεν έχει τις ίδιες μεταλλακτικές ιδιότητες όσο του EWS-FLI1[17]. Μερικά από τα γονίδια αυτά συμμετέχουν στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης, διαφοροποίησης και ογκογένεσης. Το MFNG είναι ένα απ'αυτά, που μεταφερόμενο σε άνοσο-ανεπαρκείς ποντικούς, μπορεί να τρέψει τους NIH3T3 ινοβλάστες σε ογκογόνους [48]. Η στρομελυσίνη είναι μεταλοπρωτεΐνη που μπορεί να υποβοηθεί τα ογκοκύτταρα να διεισδύουν σε γειτονικούς ιστούς. Το E2-C έχει συσχετιστεί με τον κυτταρικό κύκλο και την αποδόμηση της B –κυκλίνης [49]. Άλλα γονίδια που μπορεί να επηρεαστούν ογκογενετικά από το EWS-FLI1 είναι το MYCC, c-fos ή egfr [50,51].

B) Κυτταρική μετάλλαξη

Πειράματα που είχαν σαν στόχο να εκτιμήσουν την ιδιότητα των χμαιοειδών πρωτεϊνών να συμμετέχουν στην ογκογένεση, απέδειξαν πως όντως οι πρωτεΐνες αυτές επηρεάζουν τους αυξητικούς χαρακτήρες διαφόρων κυτταρικών σειρών. Έχει ήδη αναφερθεί πως ο ενοφθαλμισμός EWS-FLI1 ή EWS-ERG σε NIH3T3 ινοβλάστες ποντικών, μπορεί να μεταλλάξει τα κύτταρα αυτά δίνοντάς τους ογκογόνους χαρακτήρες όπως ο πολλαπλασιασμός σε μαλακό άγαρ και σε άνοσο-ανεπαρκείς ποντικούς. Η παρατήρηση πως όχι όλοι οι τύποι κυττάρων μεταλλάσσονται, ούτε αντιδρούν το ίδιο στον ενοφθαλμισμό του EWS-FLI1, σημαίνει πως η δράση των χμαιοειδών πρωτεϊνών εξαρτάται από τη «λειτουργική συγκατάθεση» του κυττάρου-ξενιστή, το οποίο με τη σειρά του σημαίνει πως πιθανόν άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες να προάγουν τη δράση του EWS-FLI1. Έχει αποδειχθεί πως η παρουσία του ILGF-1R (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor) είναι απαραίτητη για την μετάλλαξη των NIH3T3 κυττάρων [52].

Σχήμα 2. Α) Διαγραμματική απεικόνιση της δια-ανταλλαγής $t(11;22)(q24;q12)$, συχνότατα συσχετιζόμενης με σ.Ewing ή PNET. Β) Διαγραμματική απεικόνιση του γονιδίου συνένωσης EWS/FLI1. Τα εξόνια απεικονίζονται ως γραμμές επάνω στο χρωμόσωμα, ενώ οι αγκύλες περιλαμβάνουν τα σημεία κατάγματος (breakpoints).

Η παρουσία της χμαιρικής πρωτεΐνης EWS-FLI1 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των ογκογονικών χαρακτηριστικών των κυττάρων του σ.Ewing/PNET και επιπλέον έχει υποθεθεί πως μπορεί να συμμετέχει αναχαιτιστικά στη λειτουργία της απόπτωσης. Έχει αποδειχθεί πειραματικά πως ο ενοφθαλμισμός μορίων-ανταγωνιστών του EWS-FLI1 RNA σε κύτταρα σ.Ewing/PNET είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης του EWS-FLI1 με συνέπεια την αναχαίτιση της αύξησής τους σε κυτταρικές καλλιέργειες [53,54]. Αυτό σημαίνει πως η έκφραση του χμαιρικού μορίου πρέπει να ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο επίπεδο προκειμένου να αποκτήσει ογκογενετικές ιδιότητες και αφήνει ελπίδες για μελλοντική έρευνα στο επίπεδο αυτό.

Κλινική εικόνα

Το πιο συχνό σύμπτωμα που φέρνει τον ασθενή στο γιατρό είναι ο πόνος, που είναι παρών στο 90% των περιπτώσεων. Ο πόνος μπορεί να επιμένει επί εβδομάδες ή μήνες και επειδή συχνά είναι περιοδικός και υποχωρεί κατά διαστήματα, παρασύρει το γιατρό μακριά από τη διάγνωση της κακοήθειας. Οίδημα και ψηλαφητή μάζα εμφανίζεται στο 70% των περιπτώσεων και πολλές φορές οι ασθενείς επισκέπτονται το γιατρό μετά από τραύμα στην περιοχή που καθιστά το σκέλος επώδυνο [55]. Περίπου 20% των ασθενών παρουσιάζονται με πυρετό και συχνά η οξεία οστεομυελίτιδα είναι η πρώτη λανθασμένη διάγνωση. Αιμορραγική νέκρωση στη μάζα του όγκου μπορεί να προκαλέσει ερύθημα και τοπική αύξηση της θερμοκρασίας που μαζί με αύξηση της ΤΚΕ συνηγορούν στη διάγνωση αυτή. Ασθενείς με εντόπιση του σαρκώματος στο κινητό τμήμα της σπονδυλικής στήλης (αυχενική και οσφυϊκή μοίρα) συχνά εμφανίζονται με νευρολογικά συμπτώματα. Σε μια σειρά ασθενών της Mayo clinic, 58% από τους 36 συνολικά ασθενείς με εντόπιση στη σπονδυλική στήλη παρουσιάστηκαν με νευρολογικά συμπτώματα [56]. Σε έξι από αυτούς τέθηκε αρχικά λανθασμένη διάγνωση νόσου του μεσοσπονδυλίου δίσκου. Παθολογικά κατάγματα δια της περιοχής εντόπισης του όγκου, απαντούν στο 5-10% των περιπτώσεων.

Δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι ορολογικοί δείκτες για το σάρκωμα Ewing. Εργαστηριακά ευρήματα πέραν της αυξημένης ΤΚΕ που εμφανίζεται συχνά, μπορεί να περιλαμβάνουν λευκοκυττάρωση, αναιμία και υψηλή γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH), που έχει και αρνητικό ρόλο στην πρόγνωση [26, 57].

Έχει ήδη αναφερθεί πως ο όγκος προσβάλλει κυρίως μακρά οστά σκελετικά ανώριμων ασθενών. Το 65% των περιπτώσεων εμφανίζεται στη δεύτερη δεκαετία της ζωής και το σάρκωμα είναι εξαιρετικά σπάνιο πριν την ηλικία των 5 και μετά την ηλικία των 30 ετών. Περίπου 40% των όγκων προσβάλλει τον κεντρικό άξονα και σ'αυτές τις περιπτώσεις η καθυστέρηση στη διάγνωση είναι ο κανόνας αφού ο όγκος μπορεί να είναι ιδιαίτερα εκτενής πριν προκαλέσει συμπτώματα. (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Α) Επώδυνη διόγκωση της περιοχής του αριστερού ώμου σε νεαρό άτομο, 3 μήνες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Β) Σάρκωμα Ewing δεξιού λαγονίου με καθυστέρηση 5 μηνών στη διάγνωση λόγω άτυπων συμπτωμάτων. (www.google.com/ewing's sarcoma/imc.gmc.com....)

Ακτινολογικά ευρήματα

Η ακτινολογική εικόνα του σαρκώματος Ewing αντανακλά την παθολογοανατομική του πορεία. Στο αρχικό στάδιο και καθώς ο όγκος αντικαθιστά τα στοιχεία του μυελού με μικρή μόνο συμμετοχή του φλοιού, η κλασσική απεικόνιση στην απλή ακτινογραφία είναι αυτή της κεντρικής, λυτικής, διηθητικής εστίας, με ασαφή όρια και μία μάλλον ευρεία ζώνη μετάβασης σε φυσιολογικό οστόν. Σύντομα όμως ο όγκος φτάνει στο φλοιό διηθώντας τους σωλήνες του Havers και αποκολλά το περίοστεο χωρίς να προκαλεί ακόμη εκτεταμένη φλοιική βλάβη. Καθώς το περίοστεο αναγνωρίζει την προϊούσα βλάβη, προσπαθεί να την περιχαράκωσε παράγοντας περιοδικά νέα φύλλα αντιδραστικού οστού που δίνουν τη χαρακτηριστική πεταλιώδη ή «δίκην φύλλων κρεμμυδιού» εικόνα.[26,58] (Εικόνα 3)

Εάν το περίοστεο εφαρμόζει το νέο αντιδραστικό οστόν που παράγει κατά μήκος των ινών του Sharpey που το συνδέουν με τον φλοιό, δηλαδή κάθετα στον επιμήκη άξονά του, τότε η ακτινολογική εικόνα μπορεί να πάρει τη μορφή «βούρτσας» (“hair – standing –on –end”) [25,58].

Αναφέρθηκε πως ο όγκος απαντάται συνηθέστερα στα μακρά οστά και μάλιστα στο 75% στη διάφυση ή τη μεταδιάφυσή τους. Η μικρή διάμετρος των διηθητικών εστιών δεν επιτρέπει την εύκολη διάκριση μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού οστού αλλά ακόμη και στις απλές ακτινογραφίες (οι οποίες συνήθως υπό-εκτιμούν την αληθή έκταση του όγκου) ένα σημαντικό μήκος του οστού βρίσκεται συχνά να είναι μη-φυσιολογικό.

Εικόνα 3. Ακτινογραφία αριστερού μηριαίου σε κοριτσάκι 7 ετών, με ιστορικό διαλείποντος άλγους επί τετραμήνου. Κλασσική απεικόνιση λυτικής εστίας στη διάφυση με τυπική εναπόθεση, «δίκην φύλλων κρεμμυδιού», στρωμάτων νέου οστού λόγω της περιοστικής αντίδρασης. (δίκη μας περίπτωση)

Καθώς ο όγκος συνεχίζει να αυξάνει σε μέγεθος η βλάβη επεκτείνεται δια μέσω του αντιδραστικού οστού που παράγει το περίοστεο, με αποτέλεσμα την αντιδραστική φλεγμονή και εκτεταμένη διόγκωση των μαλακών μορίων γύρω από τη βλάβη. Όταν ο

όγκος διαπεράσει την κεντρική μοίρα της περιοστικής αντίδρασης τότε το «τρίγωνο του Godman» γίνεται ορατό στην εγγύς και άπω μοίρες του αντιδραστικού οστού αφού αυτές είναι ακόμη ανέπαφες.[26] (Εικόνα 4)

Εικόνα 4. Σάρκωμα Ewing στη μεταδιάφυση δεξιού μηριαίου (Α) και στη διάφυση δεξιού βραχιονίου (Β). Ο όγκος έχει διαπεράσει την κεντρική μοίρα της περιοστικής αντίδρασης αφήνοντας ανέπαφες την εγγύς και άπω: « Godman's triangles ». www.google.com/ewing's_sarcoma/imc.gmc.com/demos/mskdemo/mspath/enneking/sect14/ewing's.html-58)

Σπανίως, εάν ο όγκος δεν είναι τόσο επιθετικός, η περιοστική αντίδραση καταφέρνει να περιχαράκώσει τη βλάβη με αποτέλεσμα την διόγκωση της διάφυσης του μακρού οστού το οποίο διατηρεί την ακεραιότητα του φλοιού του που έχει μεν απολεπυνθεί αλλά περικλείει τον όγκο ο οποίος έχει «δαντελένια» όψη. (Εικόνα 5) Στις περιπτώσεις αυτές η αντίδραση των μαλακών μοριών απουσιάζει.

Εικόνα 5. Σ' αυτή τη βλάβη της διάφυσης της κερκίδας ο φλοιός έχει παραμείνει ανέπαφος αν και έχει απολεπυνθεί σημαντικά. Η «δαντελένια» όψη και η απουσία εγγύς ή άπω οριοποίησης του όγκου είναι χαρακτηριστικά του σαρκώματος Ewing. (www.google.com/ewing's_sarcoma/imc.gmc.com....)

Μεγάλες πολλαπλές λυτικές εστίες («σχωροφαγόμενο» οστόν) ή και «γεωγραφική» καταστροφή του οστού είναι επίσης πιθανό να εμφανισθούν στις ακτινογραφίες.(Εικόνα 6) Οι βλάβες είναι συνήθως αμιγώς λυτικές αλλά μπορεί να υπάρχουν και περιοχές σκλήρυνσης ιδιαίτερα εάν το σπογγώδες οστόν της μετάφυσης συμμετέχει σ’ αυτές. (Εικόνα 7) Πολύ σπάνια το σάρκωμα Ewing μπορεί να είναι κυρίως σκληρυντικό.[59]

Εικόνα 6. Απλή ακτινογραφία (Α) και Αξονική τομογραφία (Β) σαρκώματος Ewing στην άπω μετάφυση της κνήμης αγοριού 21 ετών. Εικόνα «σχωροφαγόμενου» οστού. (δική μας περίπτωση)

Η επέκταση καμιά φορά της βλάβης δια μέσου των συστημάτων του Havers στα γύρω μαλακά μόρια χωρίς την καταστροφή του φλοιού, μπορεί να οδηγήσει σε μια μεγάλη σχετικά μάζα των μαλακών μορίων η οποία πιέζοντας από έξω το φλοιό, του προκαλεί εντύπωμα σαν «ρηχό πιάτο» (saucerization).[60]

Σπάνια, η πρώτη εκδήλωση του όγκου μπορεί να είναι ένα παθολογικό κάταγμα.

Εικόνα 7. Σάρκωμα Ewing στη μεταδιάφυση της δεξιάς κνήμης κοριτσιού 8 ετών. Στην αξονική τομογραφία (Β) φαίνεται καθαρά η ύπαρξη σκληρυντικών εστιών μέσα στη μάζα του όγκου. (δική μας περίπτωση)

Η εντόπιση του σαρκώματος Ewing στα πλατέα οστά χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη συμμετοχή των μαλακών μορίων, σαφώς μεγαλύτερη από ότι στο αντίστοιχο σάρκωμα των μακρών οστών. Οι λυτικές εστίες επικρατούν και εδώ, συνδυαζόμενες σπανίως με περιοχές σκλήρυνσης. Η παραγωγή αντιδραστικού οστού είναι επίσης πιο συχνή εδώ. Όταν η βλάβη εντοπίζεται στις πλευρές τότε χαρακτηριστικά η μάζα των μαλακών μορίων επεκτείνεται ενδοθωρακικά με λίγα μόνο στοιχεία συμμετοχής του θωρακικού τοιχώματος.[61] (Εικόνα 8)

Εικόνα 8. Όγκος πλευράς θωρακικού τοιχώματος. Στην απλή ακτινογραφία (Α) φαίνεται η έντονη περιοστική αντίδραση, ενώ στην αξονική τομογραφία (Β) η μεγάλη ενδοθωρακική επέκταση της βλάβης κατά τη στιγμή της διάγνωσης. (δική μας περίπτωση)

Σπινθηρογράφημα των οστών

Λόγω της ταχείας οστικής αντίδρασης στην παρουσία του όγκου, η αυξημένη καθήλωση του ραδιοφαρμάκου προηγείται των ακτινολογικά ορατών βλαβών του οστού και αποτελεί ένα άριστο μέσο εντόπισης της πρωτοπαθούς ή των μεταστατικών εστιών. Επίσης μπορεί να δώσει μια αρχική εκτίμηση της έκτασης του όγκου κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Το Τεχνήτιο ($^{99m}\text{Tc-MDP}$) και το Γάλλιο ($^{67}\text{Ga-citrate}$) προσλαμβάνονται από τα κύτταρα του όγκου και δίνουν «θερμή» εικόνα στο σπινθηρογράφημα. (Εικόνα 9) Το Γάλλιο μάλιστα δίνει πιο σαφή εικόνα της πραγματικής έκτασης του όγκου αφού μπορεί και απεικονίζει την πρόιμη οστική αντίδραση στην παρουσία του. [62]

Εικόνα 9. Σπινθηρογράφημα με ^{99m}Tc στην περίπτωση του ασθενούς της εικόνας 6. Έντονη καθήλωση του ραδιοφαρμάκου από τα κύτταρα του όγκου και εμφανής η επέκτασή του εγγύτερα της ορατής ακτινολογικά εικόνας.

Αγγειογραφία

Το σάρκωμα Ewing είναι υπέρ-δυναμικός όγκος όσον αφορά την αιματική του άρδευση με αποτέλεσμα τη γρήγορη συγκέντρωση του σκιαστικού στην περιοχή της βλάβης κατά την αρτηριακή και τη φλεβική φάση. Η συμμετοχή των μαλακών μορίων καθώς και η δραστηριότητα του όγκου μπορούν να απεικονιστούν με ευκρίνεια.[26] (Εικόνα 10)

A

B

Εικόνα 10. Ακτινολογική απεικόνιση (A) και αγγειογραφία σαρκώματος στο κάτω πέρασ δεξιού μηριαίου. Έντονη νέο-αγγείωση στα περιβάλλοντα μαλακά μόρια (www.google/ewing's.....)

Αξονική Τομογραφία

Η αξονική τομογραφία απεικονίζει τη μορφή και την έκταση της οστικής καταστροφής καθώς και τη συμμετοχή των μαλακών μορίων και συχνά είναι επαρκής στο να καθορίσει με ακρίβεια τα όρια του όγκου. Ιδιαίτερη εφαρμογή έχει στα σαρκώματα που εντοπίζονται στην πύελο και το θώρακα όπου οι αναπνευστικές κινήσεις επηρεάζουν την ευκρίνεια της Μαγνητικής Τομογραφίας στον καθορισμό της συμμετοχής των μαλακών μορίων. (Εικόνα 11) Στα αυλοειδή οστά, πολύ λεπτές τομές κατά τον μυελό προσδιορίζουν την ενδομυελική έκταση του όγκου η οποία είναι κατά κανόνα πιο εκτεταμένη απ'ότι δείχνει η απλή ακτινογραφία.[26]

Η εφαρμογή σκιαστικού μέσου θα εντείνει την απεικόνιση των μαλακών μορίων. Η αξονική είναι επίσης χρήσιμη μέθοδος για την εκτίμηση των λεμφικών μεταστάσεων.

Μαγνητική Τομογραφία

Ο Μαγνητικός Συντονισμός (MRI) είναι αναντικατάστατος στην απεικόνιση και τον ακριβή καθορισμό της οστικής και των μαλακών μορίων συμμετοχής στη βλάβη. Στις T1-ενισχυμένες προβολές το σάρκωμα Ewing εμφανίζεται με σήμα χαμηλής έντασης και η ενδομυελική συμμετοχή διαχωρίζεται σαφώς από το υψηλής έντασης σήμα του ανέπαφου λιπώδους μυελού. (Εικόνα 12) Στις T2-ενισχυμένες προβολές ο όγκος φαίνεται με ιδιαίτερα υψηλό σήμα έντασης έναντι μυϊκού ιστού. Λιγότερο

κυτταροβριθείς περιοχές και περιοχές νέκρωσης του όγκου απεικονίζονται με μικρότερη ένταση.

Το σήμα μέσα στη μάζα του όγκου γίνεται εντονότερο μετά τη χορήγηση ενδοφλέβιου σκιαστικού (Gadopentetate Dimeglumine). Αυτή η διαφορά γίνεται εντονότερα αντιληπτή στις T1-ενισχυμένες προβολές και αφορά μόνο τις κυτταρικές περιοχές επιτρέποντας τη διάκριση των κυττάρων του όγκου από το περιβάλλον αυτά φλεγμονώδες οίδημα.[26]

Εικόνα 11. Σάρκωμα Ewing αριστερού λαγονίου σε αγόρι ηλικίας 11 ετών (Α). Η αξονική τομογραφία απεικονίζει με ευκρίνεια τη διάβρωση του οστού και την επέκταση στα μαλακά μόρια. (δική μας περίπτωση)

Εικόνα 12. Μαγνητική τομογραφία αριστερού μηριαίου (Β,Γ) στο κοριτσάκι της εικόνας 3. Στην T1-ενισχυμένη προβολή (T1-weighted image), ο όγκος απεικονίζεται με σήμα χαμηλής έντασης έναντι του ανέπαφου λιπώδους μυελού (Β). Στην T2-ενισχυμένη προβολή (T2- weighted image) τα κύτταρα του όγκου εμφανίζονται με σήμα υψηλής έντασης έναντι του μυϊκού ιστού (Γ). Στην προβολή αυτή γίνεται πιο εμφανής η επέκταση του όγκου στα μαλακά μόρια.

Διάγνωση

Το κύτταρο προέλευσης του σαρκώματος Ewing είναι ουσιαστικά άγνωστο ακόμη. Παραδοσιακά, η διάγνωσή του γίνονταν με αποκλεισμό άλλων μικροκυτταρικών στρογγυλών κυττάρων όγκων των οστών και με την ανίχνευση γλυκογόνου στα καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας την χρώση PAS (Periodic Acid-Schiff)[5]. Η πρόοδος όμως που συντελέστηκε τα τελευταία χρόνια στην κυτταρογενετική, ανοσοϊστοχημεία και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, επέτρεψε στους παθολογο-ανατόμους να αναπτύξουν μια πιο ενιαία και ασφαλή προσέγγιση στη διάγνωση των αρχέγονων νευροεκτοδερμικών όγκων, περιλαμβάνοντας και το σάρκωμα Ewing. Έχει ήδη αναφερθεί πως το υποθετικό κύτταρο καταγωγής θεωρήθηκε το ενδοθηλιακό, αγγειακής προέλευσης, αρχικά από τον ίδιο τον James Ewing για να περάσει στη συνέχεια στο αρχέγονο μεσεγχοματικό κύτταρο από άλλους ερευνητές [63] και να καταλήξει στο κύτταρο νευρικής προέλευσης σήμερα, που φαίνεται να είναι η πιο πιθανή υπόθεση [29].

Βιοψία

Με την ανάπτυξη νέων τεχνικών διάγνωσης και σταδιοποίησης των όγκων με μικρά στρογγυλά κύτταρα, μεγαλύτερα τμήματα ιστών είναι απαραίτητο να ληφθούν κατά τη στιγμή της βιοψίας. Για το λόγο αυτό η βιοψία δια λεπτής βελόνης (FNA) δεν είναι επαρκής ως το μόνο μέσο για τη λήψη παθολογικού ιστού, αλλά μεγαλύτερα τμήματα δια ανοιχτής βιοψίας (core needle or incisional biopsy) πρέπει να ληφθούν. Η λεπτή βελόνη όμως είναι εξαιρετικά χρήσιμη για τη λήψη κυτταρολογικού υλικού από μια ύποπτη μεταστατική εστία όπως ο πνεύμονας, τα οστά ή τα μαλακά μόρια, σ'έναν ασθενή στον οποίο έχει ήδη τεθεί η διάγνωση του σαρκώματος Ewing [64].

Ιδανικά η βιοψία θα πρέπει να εκτελείται από το χειρουργό που θα κάνει και την τελική επέμβαση εκτομής του όγκου. Σε μια εργασία του ο Mankin και συν. ανέφερε ότι επιπλοκές σχετιζόμενες με τη βιοψία εμφανίζονται τρεις με πέντε φορές συχνότερα όταν αυτή γίνεται στο αρχικό κέντρο που τέθηκε η διάγνωση παρά σ'αυτό που έγινε η τελική θεραπεία [65]. Η ίδια εργασία ανέφερε 4.5% επιπλέον μη απαραίτητους ακρωτηριασμούς και 8.5% μη ευνοϊκά χειρουργικά αποτελέσματα για τον ίδιο λόγο.

Η βιοψία θα πρέπει να υπολογισθεί ώστε η πορεία της βελόνης ή η χειρουργική τομή, να συμπεριληφθεί στο μελλοντικό πεδίο ακτινοβολίας ή να αφαιρεθεί εξ' ολοκλήρου κατά τη ριζική χειρουργική θεραπεία εκτομής του όγκου. Για να επιτευχθεί αυτό η χειρουργική τομή θα πρέπει να είναι επιμήκης, διασχίζοντας ένα μόνο διαμέρισμα ώστε ο επινεμημένος ιστός να είναι εξαιρέσιμος ριζικά.

Συνήθως υπάρχει άφθονος καρκινικός ιστός για τη λήψη βιοψίας στα περιβάλλοντα μαλακά μόρια ώστε η εισβολή στο οστό να αποφεύγεται γιατί η παραβίαση του φλοιού αυξάνει την πιθανότητα ενός παθολογικού κατάγματος λόγω της δημιουργίας «σημείου αυξημένου στρες» (stress riser). Εάν αυτό δεν μπορεί να αποφευχθεί, τότε η οστική βιοψία πρέπει να εκτελείται μέσω κυκλικής ή ελλειψοειδούς τομής ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος της παραπάνω επιπλοκής.[66].

Οι νευροαγγειακές γειτονικές δομές δεν πρέπει ποτέ να εκτίθενται κατά τη στιγμή της βιοψίας αφού αυτό μπορεί να καταστήσει τον όγκο μη ριζικά εξαιρέσιμο. Μετεγχειρητικά αιματώματα πρέπει να αποφεύγονται με τη χρήση επιμελούς αιμόστασης και με την αφαίρεση του αιμοστατικού επιδέσμου (tourniquet) πριν τη σύγκλειση του χειρουργικού τραύματος. Οι παροχετεύσεις θα πρέπει να τοποθετούνται κατά την επιμήκη συνέχεια της τομής, περιφερικά και κοντά σ' αυτήν ώστε να αποφευχθεί η επινέμηση επιπλέον ιστών [66]

Μακροσκοπικά ευρήματα

Κατά τη χειρουργική αποκάλυψη του όγκου, η επινέμεση των γειτονικών μαλακών μορίων είναι ο κανόνας. Συχνότατα δεν υπάρχει κάψα ή έστω ψευδοκάψα που να περικλείει τη μάζα. Ο όγκος έχει χρώμα γκριζωπό ή λευκάζων χωρίς διακριτά στοιχεία και είναι εύθρυπτος με τα δάχτυλα. Είναι ιδιαίτερα αγγειώδης και συνήθως αιμορραγεί έντονα. (εικόνα 13) Ευρείες περιοχές νέκρωσης είναι συχνές και μπορεί να πάρουν μορφή τόσο ρευστή που να δώσουν την λανθασμένη εντύπωση πύου λόγω οστεομυελίτιδας.[26] Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχει επινέμεση των μαλακών μορίων, τα πέταλα του αντιδραστικού υποπεριοστικού οστού μπορούν εύκολα να «ξεφλουδιστούν» αποκαλύπτοντας τα υπολείμματα του πορώδους μαλακού φλοιού. Ο όγκος είναι πιθανόν να επεκτείνεται σε μεγάλο μήκος της ενδομυελικής κοιλότητας χωρίς να προκαλεί καταστροφή του φλοιού, παρά ο φλοιός βρίσκεται συχνά, χαρακτηριστικά επινεμημένος από μικρές «φωλιές» του όγκου που τελικά τον διαπερνούν και αναπτύσσονται υπό-περιοστικά όπως ειπώθηκε ήδη[67]. Πολλές φορές δεν είναι δυνατόν να ληφθεί επαρκής ποσότητα του παθολογικού ιστού που βρίσκεται μεταξύ των πεταλίων του αντιδραστικού οστού ή από τον πορώδη φλοιό και είναι απαραίτητη η διάνοιξη της μυελικής κοιλότητας και η απόξυσή της για την ανάκτηση του απαραίτητου ιστού. Οι κοιλότητες που προκαλούνται με τον τρόπο αυτό στον φλοιό και την μυελική κοιλότητα πρέπει να επιπωμάτωνονται με βιολογικό τσιμέντο ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος του παθολογικού κατάγματος, της αιμορραγίας και της επέκτασης των καρκινικών κυττάρων στα γύρω μαλακά μόρια.

Άσηπτος φρέσκος ιστός πρέπει να ληφθεί για καλλιέργεια και κυτταρογενετικό έλεγχο και ένα τμήμα του να ψυχθεί για ανοσοϊστοχημικό έλεγχο και μοριακή γενετική ανάλυση. Μικρά τμήματα του ληφθέντος ιστού πρέπει να μονιμοποιηθούν σε γλουταραλδεϋδη για εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ενώ το υπόλοιπο αυτού να σταλεί για μικροσκοπική εξέταση ρουτίνας στο απλό μικροσκόπιο.

A

B

Εικόνα 13. Σάρκωμα Ewing στο άπω τμήμα κλείδας (A). Λευκωπή χροιά του όγκου και σημαντική συμμετοχή των μαλακών μορίων. Όγκος με εντόπιση το άπω τμήμα του μηριαίου (B). Εκτεταμένες περιοχές νέκρωσης και/ή αιμορραγίας με λίγα μόνο στοιχεία βιώσιμου όγκου. ([www.google.com/ewing's sarcoma/imc.gmc.com](http://www.google.com/ewing's%20sarcoma/imc.gmc.com)....)

Μικροσκοπικά ευρήματα

Κατά την πανοραμική άποψη στο απλό μικροσκόπιο αποκαλύπτονται στρώματα κυτταροβριθούς ιστού. Σε μερικές περιοχές εμφανίζονται μεγάλα συνεχή στρώματα κυττάρων χωρίς να διαχωρίζονται από πετάλια του οστού. Σε άλλα σημεία τα στρώματα αυτά μπορεί να πληρώνουν τις μυελικές κοιλότητες χωρίς να διαταράσσουν την αρχιτεκτονική του σπογγώδους μυελού και σε άλλα, συγκεντρώνονται σε οζίδια περιβαλλόμενα από ινώδη ιστό. Εκτεταμένες περιοχές αιμορραγίας ή/και νέκρωσης είναι συνήθεις. Στρώματα καρκινικών κυττάρων γεμίζουν τους διαστελλόμενους σωλήνες του Havers και επεκτείνονται στα γειτονικά μαλακά μόρια. Τα προωθημένα όρια των μαλακών μορίων συχνά επινέμουν τους περιβάλλοντες μύες ή τον αντιδραστικό ιστό, χωρίς να υπάρχει προσπάθεια για περιβρογχισμό τους από ινώδη κάψα. Προσεκτικός έλεγχος μακροσκοπικών τομών από ολόκληρο το οστόν μπορεί να αποκαλύψει απομακρυσμένα από την αρχική εστία οζίδια καρκινικών κυττάρων που συχνά ούτε οι πιο σύγχρονες απεικονιστικές μέθοδοι δεν μπορούν να εντοπίσουν. Το αν οι εστίες αυτές αντιπροσωπεύουν πολλαπλές μικροεντοπίσεις πρωτοπαθούς όγκου ή διαφυγόντες μεταστάσεις είναι μη διευκρινισμένο αλλά σίγουρα αποτέλεσαν την εστία τοπικών υποτροπών κατά την περιορισμένη χειρουργική εξαίρεση του όγκου ή και την τοπική ακτινοθεραπεία στο παρελθόν και πριν η συστηματική χημειοθεραπεία αρχίσει να εφαρμόζεται ως σταθερό μέσο καταπολέμησης του όγκου.

Με μεγαλύτερη μεγέθυνση στο απλό μικροσκόπιο τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ενιαίο σχήμα και μέγεθος. Περιέχουν μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος και παρουσιάζουν ασαφή όρια. Οι πυρήνες είναι στρογγυλοί, καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου και έχουν σαφή όρια. (Εικόνα 14) Συνήθως βρίσκονται στο κέντρο του κυττάρου και είναι πλήρεις με βασεόφιλη χρωματίνη ενώ η παρουσία πολυάριθμων πυρηνίσκων τους δίνει μια κάπως φυσαλιδώδη μορφή. Οι μιτώσεις είναι πολύ σπάνιες. Τα κύτταρα εμφανίζονται “στριμωγμένα” χωρίς ενδιάμεση μεσοκυττάρια ουσία. Πολυάριθμα μικρά τριχοειδή με μονοκύτταρο ενδοθηλιακό τοίχωμα γίνονται εμφανή, με τα καρκινικά κύτταρα να τα περιβάλλουν. Διάσπαρτα στον περιβάλλοντα ιστό ανευρίσκονται παρόμοια κύτταρα περίπου μισού μεγέθους που είναι σε διαδικασία απόπτωσης και εμφανίζονται σκούρα (dark cells) λόγω της μεγάλης πυκνότητας και έντονης χρώσης του πυρήνα τους. Σε περιοχές έντονης νέκρωσης η παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων γίνεται εμφανής.

Εικόνα 14. Τυπική απεικόνιση μικρού στρογγυλοκυτταρικού όγκου με μεγάλους κεντρικούς πυρήνες και έντονη βασεόφιλη στίξη χρωματίνης. ([www.google.com/ewing's sarcoma/imc.gmc.com...](http://www.google.com/ewing's%20sarcoma/imc.gmc.com...))

Μελέτες της υπερδομής των καρκινικών κυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, παρέχουν σημαντική υποστήριξη στη διαφορική διάγνωση των σαρκωμάτων Ewing και επίσης βρίσκουν εφαρμογή στην ταξινόμηση των μικρών στρογγυλοκυτταρικών όγκων [68,69]. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν μέγεθος περίπου 14 μm και εμφανίζουν τους χαρακτήρες που προαναφέρθηκαν. Το κυτταρόπλασμα έχει πρωτόγονους χαρακτήρες με αραιά και ασαφή οργανίδια. Τα μιτοχόνδρια είναι λίγα και μικρά.

Μια ιδιαίτερη εικόνα που μπορεί να συμβάλλει στη διάγνωση είναι η παρουσία “ψευδοροζετών” που είναι η συνάθροιση από 6-8 κύτταρα σε κύκλο γύρω από ένα μη χρωσμένο ή ελαφρώς εωσινόφιλο κέντρο. Αυτή η εικόνα μπορεί να είναι σπάνια σε μερικές βλάβες και ιδιαίτερα εμφανής σε άλλες. (Εικόνα 15)

Μια δεύτερη ιδιαίτερη εικόνα είναι η παρουσία κοκκίων γλυκογόνου σε ένα σημαντικό αριθμό βιώσιμων κυττάρων. Τα κοκκία αυτά που είναι ορατά μόνο στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να φανούν με τη χρώση PAS που τα χρωματίζει έντονα ροζ. (Εικόνα 16) Και οι δύο αυτές τεχνικές απαιτούν βιώσιμα κύτταρα και ιδιαίτερη επεξεργασία του ιστού, με τη χρήση αλκοολικού διαλύματος παρά φορμαλίνης ως μέσου σταθεροποίησης για τη χρώση PAS και επίσης κατάλληλο σταθεροποιητικό για τη μελέτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Γύρω στο 80% των σαρκωμάτων Ewing είναι PAS θετικά και επομένως η απουσία του γλυκογόνου δεν αποκλείει τη διάγνωση.

Εμφανής στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι επίσης η συνεχής μετάπτωση των ανέπαφων πρωτευόντων κυττάρων σε δευτερεύοντα αποπτωτικά κύτταρα (dark cells) που σε μερικά σημεία μπορεί να υπερτερούν.

Εικόνα 15. Παρουσία “ψευδοροζετών” χαρακτηριστική για την προέλευση του όγκου από νευρικό ιστό. ([www.google.com/ewing's sarcoma/imc.gmc.com....](http://www.google.com/ewing's%20sarcoma/imc.gmc.com....))

Εικόνα 16. Άφθονα κοκκία γλυκογόνου χρωσμένα με τη χρώση PAS εμφανίζονται ροζ στο απλό μικροσκόπιο ([www.google.com/ewing's sarcoma/imc.gmc.com....](http://www.google.com/ewing's%20sarcoma/imc.gmc.com....))

Ανοσοϊστοχημεία

Το σάρκωμα Ewing εμφανίζει παρόμοια ανοσοϊστοχημικά ευρήματα με το PNET και οι περισσότεροι συγγραφείς θεωρούν αυτές τις δύο παθολογικές οντότητες ως μια συνέχεια αλληλοεπικαλυπτόμενων ανοσοφαινοτυπικών κακοηθειών που η διαφοροδιάγνωσή τους στηρίζεται σε υποκειμενική, ημιποσοτική εκτίμηση της νευρικής διαφοροποίησής τους.

Η έκφραση των προϊόντων του γονιδίου MIC2 στην πλειονότητα των Ewing και PNET αποτελεί ένα σημαντικό διαγνωστικό στοιχείο των όγκων αυτών. Παρόλο που δεν είναι ειδικό αποκλειστικά για τους όγκους αυτούς, όταν συνδυαστεί και με άλλα ευρήματα παρέχει αρκετή ασφάλεια για τη διάγνωση. Το MIC2 είναι εντοπίζεται στην περιοχή σύζευξης των X-Y χρωμοσωμάτων και χαρτογραφείται στην Xp22,32p-ter περιοχή του X χρωμοσώματος [70]. Αυτή η περιοχή αντιστοιχεί στην ευχρωματική ζώνη p11.2p-ter, του Y χρωμοσώματος. Κωδικοποιεί μια γλυκοπρωτεΐνη συγκόλλησης στην κυτταρική μεμβράνη με MB 30Kd, την p32/30 [71,72]. Το παράγωγο αυτό ήταν αρχικά γνωστό ως το αντιγόνο, υπεύθυνο για τη συγκόλληση των T λεμφοκυττάρων και αναγνωρίζεται από το αντίσωμα 12 E7, το αντίσωμα O13 και το αντίσωμα HBA-71. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν το αντιγόνο σε μονιμοποιημένο σε παραφίνη και σταθεροποιημένο με φορμαλίνη παθολογικό ιστό [73,74]. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το MIC2 γονίδιο ανιχνεύεται στο 90% των σαρκωμάτων Ewing και PNET [75], αλλά θα πρέπει να έχει κανείς υπόψη του ότι δεν είναι ειδικό μόνο για τους όγκους αυτούς" είναι επίσης θετικό σε λεμφώματα της παιδικής ηλικίας, λεμφοκυτταρικά λεμφώματα και σποραδικά και στο ραβδομυοσάρκωμα [73,76,77].

Η Βιμεντίνη (Vimentin) είναι ο πιο συχνά απαντώμενος θετικός δείκτης και ανιχνεύεται στο 80-90% των Ewing και PNET [78,79,80].

Εικόνες νευρικής διαφοροποίησης απαντώνται συχνότατα στους όγκους αυτούς. Στο ένα άκρο βρίσκονται τα κλασσικά δείγματα σαρκώματος Ewing τα οποία είναι θετικά για Vimentin μόνο, εκφράζουν το γονίδιο MIC2, περιέχουν μεγάλες ποσότητες γλυκογόνου θετικού στη για περιοδική acid-Schiff χρώση και στερούνται πλήρως νευρικών δεικτών. Έντονη θετικότητα για περιοδική acid-Schiff χρώση εμφανίζεται στο 70% και των δύο όγκων. Στο άλλο άκρο υπάρχουν PNET με σαφή εικόνα νευρικής διαφοροποίησης στο μικροσκόπιο (ροζέτες Homer Wright στο 20% ή και περισσότερο του παθολογικού ιστού), έντονη, διάχυτη ανοσοϊστοχημική έκφραση διάφορων νευρικών δεικτών και υπέρ-μικροσκοπική εικόνα ενδεικτική της νευρικής τους προέλευσης. Μεταξύ των δύο αυτών άκρων υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία νευρικής διαφοροποίησης των οντοτήτων αυτών.

Η θετικότητα στην ειδική για το νευρώνα ενολάση (neuron-specific enolase) αποτελεί δείκτη για νευρική διαφοροποίηση με μεγάλη ειδικότητα. Στα τυπικά σαρκώματα Ewing δεν απαντάται αλλά στις άτυπες μορφές υπάρχει και από πολλούς συγγραφείς χρησιμοποιείται ως παράμετρος εκτίμησης του νευρικού τους φαινοτύπου [81]. Άλλοι δείκτες νευρικής διαφοροποίησης που στο τυπικό σάρκωμα Ewing είναι αρνητικοί είναι το Leu-7, νευροινίδια 200 Kd, η πρωτεΐνη S-100 κτλ [82,83].

Έχει επίσης αποδειχτεί ότι το σάρκωμα Ewing και το PNET είναι ισχυρά θετικά για δείκτες νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης της οικογένειας της χρωμογρανίνης όπως τα CgC-SgII ενώ είναι αρνητικά για τους δείκτες CgA, CgB της ίδιας οικογενείας, που εκφράζουν όμως τα νευροβλαστώματα [84].

Πρόσφατες μελέτες συνέδεσαν μια ακόμη οικογένεια πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις διαμεμβρανικές μεταφορές ως υποδοχείς μορίων, με τους δύο αυτούς όγκους. Οι δείκτες αυτοί που ανήκουν στην Trk οικογένεια των κινασών της τυροσίνης είναι απαραίτητες για τη νευρική διαφοροποίηση και αποτελούν υποδοχείς αυξητικών παραγόντων του

νευρικού κυττάρου [85,86]. Η παρουσία των TrKB και TrKC φαίνεται να χαρακτηρίζει το Ewing χωρίς νευρική διαφοροποίηση ενώ το TrKA άλλες οντότητες με νευρικούς χαρακτήρες.

Κυτταρογενετική και Μοριακή βιολογία

Έχει ήδη αναφερθεί πως με την πρόοδο της κυτταρογενετικής και μοριακής βιολογίας νέα στοιχεία, τυπικά για τη διάγνωση των σαρκωμάτων της οικογενείας Ewing ήρθαν στην επιφάνεια.

Η αμοιβαία δια-ανταλλαγή μεταξύ των χρωμοσωμάτων 11 και 22 που αφορά τις δέσμες q24 και q12 [t(11;22)(q24;q12)] αντίστοιχα, εμφανίζεται στη συντριπτική πλειοψηφία και απαντά στο 90% περίπου των σαρκωμάτων Ewing, PNET και Askin του θωρακικού τοιχώματος. Η δια-ανταλλαγή t(11;22)(q24;q12) μπορεί να επιδειχθεί κυτταρογενετικά και πριν την κλωνοποίηση των χρωμοσωματικών καταγμάτων, αυτό αποτελούσε το μόνο στοιχείο για τη διάγνωση των Ewing ή των PNET. Μελέτες σε μοριακό επίπεδο απέδειξαν πως το «κάταγμα» του χρωμοσώματος 22 εμφανίζεται δια του γονιδίου EWS ενώ αυτό του χρωμοσώματος 11 δια του γονιδίου FLI-1. Στη συνέχεια η περαιτέρω διαφοροδιάγνωση των όγκων της οικογένειας αυτής θα στηριχθεί στο βαθμό της νευρικής τους διαφοροποίησης η οποία είναι σαφώς ευκρινέστερη στα PNET, ενώ για τις άτυπες μορφές του σαρκώματος Ewing τα διαγνωστικά κριτήρια δεν είναι ακόμη απόλυτα ευκρινή.

Ο πίνακας 1 συνοψίζει τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη διαγνωστική εκτίμηση του ασθενούς με σάρκωμα Ewing [64].

Πίνακας 1. Διαγνωστική προσέγγιση ασθενούς με σάρκωμα Ewing.

Τοπική βλάβη <ul style="list-style-type: none">• Απλές ακτινογραφίες του οστού• CT και/ή MRI για εκτίμηση του μεγέθους και της επέκτασης του όγκου• Εκτίμηση από ακτινοθεραπευτή• Εκτίμηση από χειρουργό• Εκτίμηση από ειδικούς αποκατάστασης	Εκτίμηση του παθολογικού ιστού <ul style="list-style-type: none">• Ιστολογική εξέταση ρουτίνας• Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο• Ανοσοϊστοχημεία• Κυτταρογενετική• Μοριακή Βιολογία
Μεταστατική νόσος <ul style="list-style-type: none">• CT Θώρακος• Σπινθηρογράφημα οστών• Παρακέντηση μυελού των οστών και βιοψία• Υπολογισμός LDH του ορού	Προχρημιοθεραπευτική εκτίμηση <ul style="list-style-type: none">• Νεφρική λειτουργία: Ουρία, κρεατινίνη, BUN, ανάλυση ούρων• Ηπατική λειτουργία: Χολερυθρίνη, τρανσαμινάσες ορού (SGOT, SGPT)• Καρδιακή λειτουργία: Ραδιοϊσοτοπική αγγειογραφία ή ηχοκαρδιογράφημα

Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση του σαρκώματος Ewing πέρα από τους υπολοίπους όγκους της ίδιας οικογενείας περιλαμβάνει μια ευρεία ποικιλία μεσεγχυματικών και επιθηλιακών όγκων (πρωτοπαθών και μεταστατικών) που εμφανίζονται στην παιδική και εφηβική ηλικία, αλλά και στους ενήλικους.

Η διαφοροδιάγνωση του σαρκώματος Ewing στην παιδική και εφηβική ηλικία πρέπει να περιλαμβάνει το μεταστατικό νευροβλάστωμα, το μικροκυτταρικό οστεοσάρκωμα, το μεσεγχυματικό χονδροσάρκωμα, το ραβδομυοσάρκωμα και κακοήθειες του αιμοποιητικού συστήματος [87,88,89]. Ιδιαίτερα σπάνιες μορφές του όγκου σε μεγαλύτερους ασθενείς χρήζουν διαφοροδιάγνωσης από τα μεταστατικά μικροκυτταρικά καρκινώματα και τα λεμφώματα.

Το νευροβλάστωμα τυπικά αφορά την βρεφική και νηπιακή ηλικία [90]. Η πλειονότητα των κακοηθειών αυτών εντοπίζεται κατά την πρώτη πενταετία της ζωής. Ο όγκος συχνά μεθίσταται στο οστά, το ήπαρ, τους λεμφαδένες, και το δέρμα. Η μεταστατική νόσος μπορεί να είναι η πρώτη εκδήλωσή του. Τα αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών στο αίμα και των μεταβολιτών τους στα ούρα είναι ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο. Ιστολογικά, η παρουσία νευροφιλικής και γαγγλιονικής διαφοροποίησης είναι επίσης χρήσιμη στη διάγνωση. Πολλοί δείκτες νευρικής διαφοροποίησης όπως η χρωμογρανίνη και η γλοιακή ινώδης όξινη πρωτεΐνη είναι δυνατόν να εμφανιστούν και στους τρεις τύπους όγκων (Ewing, PNET και νευροβλάστωμα) αναλόγως με το βαθμό της νευρικής διαφοροποίησης των δύο πρώτων, καθιστώντας δύσκολη τη διάγνωση ενίοτε [91]. Ακόμη και πλούσια σε γλυκογόνο νευροβλαστώματα που προσομοιάζουν ιδιαίτερα το σάρκωμα Ewing έχουν περιγραφεί [92].

Ο δείκτης που φαίνεται να είναι σημαντικότερος για τη διαφοροδιάγνωση φαίνεται να είναι το MIC2 γονίδιο, η έκφραση του οποίου είναι αισθητά απύουσα από το νευροβλάστωμα και φυσικά η τυπική για τους όγκους της οικογενείας Ewing χρωμοσωμική δια-ανταλλαγή t(11;22)(q24;q12) και η δια-μετατόπιση του γονιδίου EWS που απουσιάζει από το νευροβλάστωμα. Ακόμη, ιδιαίτερα σημαντική για τη διαφοροδιάγνωση είναι η όλη κλινική εικόνα του τελευταίου (παρουσία επινεφριδικής μάζας, αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών του ορού, μορφή σκελετικής κατανομής κτλ) που τελικά καθιστούν τη διάκρισή τους όχι δύσκολη.

Το μικροκυτταρικό οστεοσάρκωμα μπορεί επίσης να μιμηθεί τον όγκο του Ewing [93,94,95] και μάλιστα από πολλούς συγγραφείς υποστηρίζεται πως όγκοι που μικροσκοπικά εμφανίζουν οστεοπαραγωγική δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων τους αλλά ανοσοϊστοχημικά και μοριακά βιολογικά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά του σαρκώματος Ewing – παρουσία της χρωμοσωμικής δια-ανταλλαγής t(11;22)(q24;q12) ή τυπικά πρότυπα γονιδιακής σύζευξης – θα έπρεπε να κατατάσσονται στους όγκους της τελευταίας ομάδας [96].

Το μεσεγχυματικό χονδροσάρκωμα μπορεί να αποτελέσει διαγνωστικό δίλημμα όταν το χόνδρινο στοιχείο απουσιάζει από το δείγμα της βιοψίας. Μικροσκοπικά η παρουσία άτυπης εικόνας σαν αιμάγγειοπερικύττωμα και επίσης εστιών άτυπου χονδρικού ιστού που χρώνονται θετικά για την πρωτεΐνη S-100, είναι σαφής για τη διάγνωση [97,98,99].

Το ραβδομυοσάρκωμα εμβρυονικού τύπου και ιδιαίτερα το κυψελιδικό, ανήκει στους όγκους μικρών-στρογγυλών-κυττάρων και πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί επίσης από το Ewing, ιδιαίτερα όταν οι κακοήθεια αφορά στα μαλακά μόρια μικρών παιδιών [100]. Παρόλο που αρκετά συχνά κατά τη μελέτη κατεψυγμένων τομών ιστού η διάκρισή τους είναι δύσκολη, η θετικότητα των καρκινικών κυττάρων για μυϊκούς δείκτες και η παρουσία "φωλεών" και κυψελίδων δεν αφήνει αμφιβολία για τη διάγνωση.

Το πρωτοπαθές λέμφωμα των οστών είναι πολύ σημαντικός όγκος που πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί από το Ewing. Γενικά το δεύτερο εμφανίζει μεγαλύτερη συμμετοχή μαλακών μορίων από το πρώτο. Το πρωτοπαθές λέμφωμα των οστών αφορά άτομα μεγαλύτερης ηλικίας αλλά ενίοτε τα όρια αυτά μπορεί να αλληλοεπικαλύπτονται. Το Ewing εμφανίζεται πιο καταστρεπτικό στην ακτινολογική απεικόνιση ενώ το λέμφωμα παρουσιάζει πιο εκτεταμένη την παραγωγή αντιδραστικού οστού και συχνά μια μεικτή λυτική και σκληρυντική εικόνα. Ο ρόλος της ανοσοιστοχημείας είναι σημαντικός στη διάγνωση. Τα περισσότερα λεμφώματα είναι θετικά για το κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο, ενώ το Ewing είναι αρνητικό. Ακόμη το τελευταίο όντας θετικό στο 90% των περιπτώσεων για το γονίδιο MIC2 και το HBA71 δεν αφήνει αμφιβολίες για τη διάγνωση. [101].

Όγκοι μικρών στρογγυλών κυττάρων στους ηλικιωμένους είναι σπάνιο να αφορούν το σάρκωμα Ewing. Το μεταστατικό λέμφωμα και καρκίνωμα είναι οντότητες που εμφανίζονται μετά το 40^ο έτος της ηλικίας και μπορούν να διαγνωσθούν με την κατάλληλη ανίχνευση επιθηλιακών και λεμφικών δεικτών.

Όταν δεν είναι σαφές εάν η πρωτοπαθής εστία αφορά όγκο οστών ή μαλακών μορίων τότε το υψηλού βαθμού κακοήθειας μυξοειδές χονδροσάρκωμα των μαλακών μορίων και το αδιαφοροποίητο συνοβιακό σάρκωμα πρέπει να συμπεριληφθούν στη διάγνωση. Σπανίως το σκληρωτικό επιθηλιοειδές ινοσάρκωμα, το κακόηθες μελάνωμα και ακόμη και η λαχνοοζώδης τενοντοελυτρίτιδα μπορεί να μιμηθούν στρογγυλοκυτταρικό όγκο μικρών κυττάρων [61,100].

Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στη διαφοροδιάγνωση του σαρκώματος Ewing από την οστεομυελίτιδα αφού πολλά από τα παιδιά παρουσιάζονται με μια καθυστέρηση τριών ή τεσσάρων μηνών από την έναρξη των άτυπων συμπτωμάτων, κατά τη διάρκεια των οποίων έχουν αντιμετωπισθεί με αντιβιοτικά. Το γεγονός πως συχνά οι δύο οντότητες μπορεί να συνυπάρχουν καθυστερεί περαιτέρω την τελική διάγνωση.

Πρόγνωση

Το σάρκωμα Ewing ανήκει στην κατηγορία των πιο επιθετικών όγκων και έχει ιδιαίτερη τάση να υποτροπιάζει τοπικά και να δίνει απομακρυσμένες μεταστάσεις, οι οποίες εντοπίζονται κατά κανόνα στους πνεύμονες. Πριν την συμμετοχή της χημειοθεραπείας στην αντιμετώπισή του, η πρόγνωση ήταν πολύ φτωχή, με την 5-ετή επιβίωση να φτάνει μετά βίας το 20%. Η χρήση της ακτινοθεραπείας και της πολυφαρμακευτικής χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με τις σύγχρονες τεχνικές χειρουργικής εξαίρεσης έχουν βελτιώσει θεαματικά την πρόγνωση. Οι ασθενείς που κατά τη διάγνωση έχουν εντοπισμένη, εξαιρέσιμη βλάβη και αντιμετωπίζονται χημειοθεραπευτικά με σύγχρονα σχήματα πολλαπλών παραγόντων σε συνδυασμό με χειρουργική θεραπεία έχουν 5-ετή επιβίωση της τάξης του 70% [102,103,2]. Για τους ασθενείς όμως που κατά τη διάγνωση η νόσος εμφανίζει διασπορά, η επιβίωση αυτή είναι πολύ μικρότερη, της τάξης του 30%. Όπως και για το οστεοσάρκωμα, έχει αποδειχθεί ότι η χειρουργική αφαίρεση των εξαιρέσιμων πνευμονικών μεταστάσεων βελτιώνει την πρόγνωση. Η παρουσία των πνευμονικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση αποτελεί τον πιο σημαντικό αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για το σάρκωμα Ewing. Η εμφάνιση διασποράς του όγκου κατά τη διάγνωση είναι δυστυχώς συχνή και περίπου 15-28% των ασθενών παρουσιάζουν ήδη μεταστάσεις κατά την αρχική διάγνωση [104,105,106,107].

Μια ποικιλία κλινικών παραγόντων όπως η ηλικία και το φύλο, η εστία εντόπισης του πρωτοπαθούς όγκου και το μέγεθός του και διάφοροι εργαστηριακοί δείκτες έχουν αποδειχθεί να επηρεάζουν την πρόγνωση.

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει αποδείξει πως η νεαρότερη ηλικία κατά τη διάγνωση αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα [8,108]. Ασθενείς μικρότεροι των 10 ετών εμφανίζουν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία, μικρότερη συχνότητα τοπικών υποτροπών και γενικότερα πιο παρατεταμένη επιβίωση από ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας [109]. Υπάρχουν όμως και μελέτες, κυρίως από γαλλικά αντικαρκινικά κέντρα που υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη φυσική εξέλιξη της νόσου σε σχέση με την ηλικία [110] και ακόμη άλλες μελέτες από ανεξάρτητα μεταξύ τους κέντρα που υποστηρίζουν την έλλειψη σχέσης μεταξύ ηλικίας και επιβίωσης [111,112]. Μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων εργασιών παρουσιάζει αντικρουόμενα συμπεράσματα όσον αφορά τη σχέση του φύλου με την επιβίωση από τη νόσο [113,114]. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της εκτεταμένης μελέτης SEER έδειξε σημαντικά καλύτερη πρόγνωση για την 5-τή επιβίωση σε ασθενείς του γυναικείου φύλου [115].

Η εστία εντόπισης του πρωτοπαθούς όγκου είναι ένας άλλος σημαντικός προγνωστικός παράγοντας. Ασθενείς με εντόπιση του όγκου στα μακρά οστά όπου είναι εξαιρεσιμος, έχουν πολύ καλύτερη πρόγνωση από εκείνους που εμφανίζουν την πρωτοπαθή εστία στα οστά του κορμού, όπως στη λεκάνη και το θωρακικό τοίχωμα. Στους τελευταίους ο όγκος κατά τη διάγνωση είναι αρκετά μεγαλύτερος και η συμμετοχή των μαλακών μορίων είναι επίσης εκτεταμένη.

Το μέγεθος του όγκου όπως υπολογίζεται στον απεικονιστικό έλεγχο έχει επίσης αρνητική προγνωστική σημασία για την επιβίωση [102,116]. Ασθενείς με πρωτοπαθή εστία μικρότερη των 100ml έχουν 3-ετή επιβίωση που μπορεί να ξεπεράσει και το 80% σε αντίθεση με εκείνους που εμφανίζουν βλάβες μεγαλύτερου μεγέθους και έχουν αντίστοιχη επιβίωση της τάξης του 32% [117]. Η αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ επιβίωσης και μεγέθους του όγκου έχει αποδειχθεί από διάφορους ερευνητές αλλά το όριο για να χαρακτηριστεί μια εστία μεγάλη ή μικρή ήταν τα 200ml [102].

Σειρά από μελέτες έχει επίσης αποδείξει ότι μερικές κλινικές εργαστηριακές παράμετροι, όπως η αύξηση της γαλακτικής δευδρογενάση (LDH) στον ορό, η αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών και η λευκοκυττάρωση αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες και πιθανότατα αντανακλούν σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου [105,117].

Παράμετροι κατά τη μικροσκοπική εξέταση του παθολογικού ιστού, όπως η παρουσία εκτεταμένων νεκρωτικών εστιών χωρίς να έχει προηγηθεί θεραπευτική αντιμετώπιση του όγκου, υποτίθεται πως δηλώνουν επιθετική κλινική συμπεριφορά και έχουν αρνητική προγνωστική σημασία [104,113]. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως η παρουσία "σκοτεινών" (dark) αποπτωτικών κυττάρων και η εικόνα "χρυσοκέντητου κεντήματος" (filigree pattern) στο μικροσκόπιο αποτελούν πιο αξιόπιστους δείκτες για την αρνητική πρόγνωση απ' ότι η εκτεταμένη νέκρωση [118]. Αυτή η περίεργη εικόνα του σαρκώματος Ewing (filigree pattern) τυπικά ανευρίσκεται στο στοιχείο του που αφορά τα μαλακά μόρια και σχεδόν ποτέ στην ενδομυελική εντόπιση αυτού. Η παρουσία της μεταφράζεται από μερικούς συγγραφείς ως εισβολή στα μαλακά μόρια και τη συσχετίζουν με μεγαλύτερου μεγέθους και βαθμού κακοήθειας βλάβη [113]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η παρουσία της εικόνας αυτής στο μικροσκόπιο (filigree pattern) συσχετίζεται με αρνητική πρόγνωση ανεξάρτητα από διαφορές στη μορφολογία και τη φαινοτυπική διαφοροποίηση του όγκου [118].

Η ύπαρξη υψηλού μιτωτικού δείκτη (μία ή περισσότερες μιτώσεις ανά πεδίο υψηλής μεγέθυνσης-High Power Field-) έχει υποστηριχθεί πως έχει αρνητική πρόγνωση επίσης [104].

Η ανίχνευση και η ποσότητα του κολλαγόνου, ο βαθμός αγγείωσης του όγκου και η εισβολή του από νέα τριχοειδή δεν φάνηκε να έχουν στατιστική συσχέτιση με την πρόγνωση [116].

Η μετεγχειρητική εκτίμηση της νέκρωσης του όγκου μετά από χημειοθεραπεία (ομοίως με το οστεοσάρκωμα) αποτελεί σημαντικότατο παράγοντα για την πρόγνωση του βαθμού ελέγχου της τοπικής νόσου και του χρόνου ελευθέρως-νόσου [119,120,55]. Θετική απάντηση στη χημειοθεραπεία, η οποία ορίζεται ως 90-100% νέκρωση, φαίνεται να αποτελεί ισχυρό θετικό προγνωστικό παράγοντα για μακρά επιβίωση. Ακόμη ο βαθμός νέκρωσης του όγκου μετά τη χημειοθεραπεία φαίνεται να έχει θετική σχέση με το χρόνο ελευθέρως νόσου των ασθενών αυτών. Σε μια μελέτη του ινστιτούτου Rizzoli, η 5-ετής επιβίωση χωρίς σημεία υποτροπής ήταν 90% για τους ασθενείς που παρουσίασαν πλήρη νέκρωση του όγκου μετά τη χημειοθεραπεία, 53% γι'αυτούς με υπολειπόμενη βλάβη ελεγχόμενη μικροσκοπικά και 32% για εκείνους που η πρωτοπαθής βλάβη έδειχνε μακροσκοπικά στοιχεία υπολειπόμενου όγκου [119].

Μεταβολές ογκογονιδίων όπως το c-erb-B2, p53, και MDM2 παρατηρούνται πολύ σπάνια και δεν έχει αποδειχθεί να έχουν ρόλο στην παθογένεση ή την πρόγνωση του σαρκώματος Ewing. Ανοσοιστοχημική διερεύνηση για υπερ-έκφραση γονιδίων που θεωρούνται υπεύθυνα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φάρμακα, όπως η P-γλυκο-πρωτεΐνη, δείχνουν υποσχόμενα αρχικά αποτελέσματα αλλά η βιβλιογραφία είναι ακόμη ελλιπής [121].

Θεραπεία

Χημειοθεραπεία—Έλεγχος της συστηματικής νόσου

Όταν ο James Ewing συνειδητοποίησε από το 1921 ακόμη ότι ο όγκος που φέρει το όνομά του απαντούσε στην ακτινοθεραπεία, όλοι οι ασθενείς αντιμετώπιζονταν με τοπική μόνο καταπολέμηση της βλάβης μέσω ακτινοβολίας για να επανακύψουν όμως σύντομα με σημεία γενικευμένης νόσου. Μόνο μετά την είσοδο της χημειοθεραπείας με πολλαπλούς παράγοντες στην αντιμετώπιση του όγκου, αναφέρθηκαν θεραπευτικά αποτελέσματα μακράς επιβίωσης [122]. Σήμερα, επιβίωση μακράς διάρκειας ελευθέρως νόσου μπορεί να επιτευχθεί σε άνω το 50% των ασθενών [123].

Το 1976 ο Jaffe και συν.[124] ανέφερε ανώτερα αποτελέσματα με τη χρήση ενός σχήματος συνδυασμένης χημειοθεραπείας που ονόμασε “VAC” (από τα αρχικά Vincristine, Actinomycin D, Cyclophosphamide) σε σύγκριση με τη θεραπεία με ένα μόνο παράγοντα. Το 1975 και 1976 άλλοι ερευνητές [125,126] ανέφεραν πολύ καλά αποτελέσματα με σχήματα περιλαμβάνοντα Doxorubicin. Η σημαντικότητα της έντασης της πρώτης δόσης του φαρμάκου αυτού φάνηκε από τις αναφορές του IESS II όπου αποδείχθηκε ότι παρόλο που η συνολική δόση της Δοξορουβικίνης ήταν η ίδια σε δύο τυχαιοποιημένες ομάδες, τα αποτελέσματα ήταν ανώτερα σ'αυτούς που έλαβαν μεγαλύτερη αρχική δόση παρά σ'εκείνους που έλαβαν μικρότερες δόσεις για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα [127]. Αξιοσημείωτο είναι ότι μέχρι σήμερα τα σχήματα αυτά αποτελούν τους βασικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες αντιμετώπισης της νόσου. Η αιμορραγική κυστίτιδα ήταν το μεγαλύτερο πρόβλημα τοξικότητας της Κυκλοφωσφαμίδης πριν την είσοδο του προστατευτικού για το ουροποιητικό επιθήλιο φαρμάκου, MESNA.

Η Ιφωσφαμίδη (Ifosfamide), ένας αλκυλιωτικός παράγοντας συγγενής προς την Κυκλοφωσφαμίδη, μπορεί να χορηγηθεί μαζί με MESNA σε δόσεις μεγαλύτερες του τετραπλάσιου (6-9 g/m² /course αντί 1.2-1.5 g/m²/course) από ότι χορηγείται η δεύτερη με πολύ μικρότερη τοξικότητα [128]. Από τότε που το φάρμακο αποδείχθηκε αποτελεσματικό σε ανθεκτικούς ή υποτροπιάζοντες όγκους άρχισε να χρησιμοποιείται σε πρώτη γραμμή για σαρκώματα Ewing υψηλής κακοήθειας με καλά αποτελέσματα ελέγχου της νόσου και μακρά επιβίωση [129,130]. Πρόσφατα η χορήγηση υψηλών δόσεων κυκλοφωσφαμίδης σε συνδυασμό με MESNA και μέγιστη υποστηρικτική θεραπεία περιλαμβανομένου του Παράγοντα Ενεργοποίησης του Κλώνου Κοκκιοκυττάρων (Granulocyte Colony Stimulating Factor-GCSF-), έδωσε ανάλογα αποτελέσματα με τη χρήση της Ιφωσφαμίδης αλλά οι έρευνες συνεχίζονται [131,132].

Η Ετοποσίδη (Etoposide), ένας αναστολέας της τοποισομεράσης II έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του σαρκώματος Ewing την τελευταία δεκαετία. Σε μια μελέτη αντιμετώπισης υποτροπιασθέντος όγκου, με ένα μόνο χημειοθεραπευτικό παράγοντα, 3 από τους 15 ασθενείς απάντησαν στην ετοποσίδη [133]. Οι αναστολείς της τοποισομεράσης II, αναστέλλουν την ανακατασκευή του DNA γι αυτό και τα καλύτερα αποτελέσματα δίνουν όταν συνδυαστούν με φάρμακα που καταστρέφουν το DNA όπως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες. Συνδυασμοί ετοποσίδης με ιφωσφαμίδη έδωσαν θετικά αποτελέσματα σε 16 από 17 ασθενείς με υποτροπιάζων σάρκωμα Ewing [134] και σε 25 από 26 αρρώστους με πρωτοπαθή όγκο [135]. Μια τυχαιοποιημένη μελέτη που συγκρίνει το συνδυασμό Vincristine, Doxorubicin, Ifosfamide και Actinomycine D (VAIA) με τον αντίστοιχο VAIA + Etoposide ξεκίνησε από την European Intergroup Co-Operative Ewing's Sarcoma study 92 (EICESS 92) της Γερμανικής/Αυστριακής/Ολλανδικής Society of Paediatric Oncology and Haematology (GPOH) και του United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG) τα αποτελέσματα δεν έχουν ακόμη ανακοινωθεί επίσημα [136]. Τα πιο σύγχρονα χημειοθεραπευτικά σχήματα χρησιμοποιούν παραλλαγές δόσεων Doxorubicin με VAC, συνήθως συνδυαζόμενα με Ifosfamide και/ή Etoposide [137,138]. Φάρμακα όπως η σισπλατίνη, η μεθοτρεξάτη, και η μπλεομυκίνη δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στο σάρκωμα Ewing [139] γι αυτό και δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά μ' αυτά.

Οι σύγχρονες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ένταση της χημειοθεραπείας [140]. Μια πολλά υποσχόμενη τεχνική αφορά αυξημένη ένταση δόσης – χρόνου ιδιαίτερα κατά την έναρξη της θεραπείας π.χ πριν την αντιμετώπιση της τοπικής εστίας. Η αύξηση της δόσης των φαρμάκων και η μείωση των μεσοδιαστημάτων χορήγησής τους μπορεί να επιτευχθεί με σύγχρονες τεχνικές μέγιστης υποστήριξης συμπεριλαμβανομένου του GCSF. Ένας άλλος τρόπος να χορηγηθεί υψηλή δόση χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι εάν αυτοί συνδυαστούν με χορήγηση αυτόλογων πρωτογενών (stem) κυττάρων του αίματος. Οι πιο πολλές από αυτές τις θεραπείες υψηλής έντασης χρησιμοποιούν Melphalan συχνά σε συνδυασμό με Etoposide, Carboplatinum, Cyclophosphamide και Thiotepa και καμιά φορά με ακτινοβολία ολοκλήρου του σώματος. Σε μη κοντρολαρισμένες μελέτες, τέτοιες στρατηγικές βρέθηκε να έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε πολύ-εστιακή διεσπαρμένη ή υποτροπιάζουσα νόσο [141, 142]. Από τα σχήματα αυτά ο συνδυασμός melphalan και busulfan βρέθηκε να είναι ανώτερος από τα υπόλοιπα [143].

Μεγάλες μελέτες φάσης II/III έχουν αρχίσει στην Αμερική [144], Ιταλία [145], Σκανδιναβία [146] και Ευρώπη. Η ευρωπαϊκή EURO-EWING 99 μελέτη είναι μια συνδυασμένη μελέτη από τις ακόλουθες ομάδες: GPOH, UKCCSG, Societe Fransaise Oncologie Paediatrique (SFOP), Swiss Institute of Applied Cancer Research (SIAC) και European Organization for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC-STBSG) [132]. Αυτή αποτελεί προς στιγμήν τη μεγαλύτερη

μελέτη φάσης III στον κόσμο. Η αρχική θεραπεία αποτελείται από 6 συνεδρίες Vincristine, Ifosfamide, Doxorubicin και Etoposide (VIDE) ακολουθούμενη από τελειωτική θεραπεία ανάλογη με την κάθε φορά ταξινόμηση και τυχαιοποίηση των ασθενών σε σχέση με τους παράγοντες κινδύνου (μεταστάσεις κατά τη διάγνωση, ιστολογική απάντηση του όγκου στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία με VIDE και το μέγεθος του όγκου σε ανεγχείρητες περιπτώσεις). Ασθενείς με συνήθη ένταση κακοήθειας του όγκου (καλή ιστολογική απάντηση στην αρχική χημειοθεραπεία, $\leq 10\%$ βιώσιμων καρκινικών κυττάρων στο χειρουργικό παρασκεύασμα), τυχαιοποιούνται για VAI (Vincristine, Actinomycine D, Ifosfamide) έναντι VAC. Ασθενείς με υψηλό βαθμό κακοήθειας του όγκου τυχαιοποιούνται για VAI έναντι θεραπείας υψηλής έντασης με Busulphan και Melphalan (Bu-Mel) με ταυτόχρονη θεραπεία υποστήριξης με αυτόλογα πρωτογενή κύτταρα του αίματος. Εκτός από το χρόνο ελευθέρως νόσου καταγραφή της τοξικότητας και εκτίμηση της σημασίας της μικρομεταστατικής ή υποτροπιάζουσας νόσου στο μυελό των οστών, με RT-PCR είναι παράμετροι που ελέγχονται σ' αυτή τη μελέτη. Τα αποτελέσματα αναμένονται το 2004-2005.

Για μια νόσο όπως το σάρκωμα Ewing του οποίου η φυσική πορεία οδηγεί είναι θανατηφόρος και όπου παραπάνω από το 50% των ασθενών μπορεί να θεραπευτεί με πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία, κάθε επιπλοκή ακόμη και από τις πιο σοβαρές είναι θεμιτή. Οι οξείες επιπλοκές της χημειοθεραπείας αφορούν τις κυτταροστατικές ιδιότητες των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται. Παροδική απώλεια του τριχωτού της κεφαλής παρατηρείται πάντα και επίσης έμετος. Όλα τα κυτταροστατικά φάρμακα είναι μυελοτοξικά και μπορεί να οδηγήσουν σε αναιμία, αιμορραγίες αυξάνοντας συνεπώς τους κινδύνους από μετάγγιση όπως η ηπατίτιδα και το AIDS. Ο πιο μεγάλος κίνδυνος όμως προέρχεται από την ανοσοκαταστολή που προκαλούν. Μοιραίες λοιμώξεις από άτυπα μικρόβια όπως η *pneumocystis carinii* (προφύλαξη με τριμεθοπρίμη/κοτριμοξαζόλη) είναι συχνές. Η χρήση του GCSF συνίσταται για τους ασθενείς εκείνους που εμφάνισαν λοιμώξεις στα πρώιμα στάδια της θεραπείας τους. Υπάρχουν όμως και επιπλοκές που αφορούν κάθε παράγοντα χωριστά: τα αλκυλιωτικά φάρμακα (Cyclophosphamide, Ifosphamide) προκαλούν αιμορραγική κυστίτιδα η οποία μπορεί να προληφθεί με ενυδάτωση και MESNA. Η Ifosfamide έχει συσχετιστεί με τοξικότητα του ΚΝΣ (νωθρότητα, σπασμοί ή και κώμα) που προλαμβάνεται με ανταγωνιστικά φάρμακα όπως το μπλε του μεθυλενίου. Νεφρική σπειραματική ή και σωληναριακή νέκρωση μετά από αθροιζόμενες δόσεις Ifosfamide μπορεί να οδηγήσουν σε μοιραίες διαταραχές ηλεκτρολυτών όπως φωσφόρου, διττανθρακικών, καλίου, γλυκόζης και ακόμη αμινοξέων. Η παρακολούθηση λοιπών των επιπέδων τους στον ορό είναι πρωταρχικής σημασίας αφού δεν υπάρχει τρόπος να προληφθούν τα σύνδρομα. Η Vincristine προκαλεί περιφερική νευροπάθεια με την πάρεση του περονιαίου νεύρου ως το πρώτο συνήθως σημείο, αλλά ακόμη και κοιλιακά άλγη, μέχρι και παραλυτικό ειλεό. Τα συμπτώματα αυτά κατά κανόνα υποχωρούν σταδιακά εάν το φάρμακο διακοπεί. Η ηπατοτοξικότητα με κύριο σύνδρομο την απόφραξη των ηπατικών φλεβών είναι η βασική επιπλοκή της Actinomycin D.

Οι πιο σοβαρές πάντως επιπλοκές κατά τη θεραπεία του Ewing αφορούν τη χορήγηση της Doxorubicine. Καρδιοτοξικότητα εμφανίζεται συνήθως μετά αθροιστικές δόσεις που ξεπερνούν τα 500 mg/m². Θάνατοι από ανακοπή της καρδιάς έχουν καταγραφεί ακόμη και 10 χρόνια μετά σε τέτοιους ασθενείς, ακόμη και με δόσεις που αθροιστικά ήταν μικρότερες των 400 mg/m². Καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες όπως η amifostine και dexrazoxane είναι υπό έρευνα και η εκτίμηση της καρδιακής λειτουργίας όπως και ο συχνός έλεγχός της θεωρούνται απαραίτητες.

Έλεγχος της Τοπικής νόσου

Γενικά, η σύγχρονη στρατηγική αντιμετώπισης του όγκου είναι α) έντονη προεγχειρητική χημειοθεραπεία (Neo-adjuvant chemotherapy), επανασταδιοποίηση της τοπικής νόσου και β) απόφαση για χειρουργική θεραπεία ή ακτινοθεραπεία με επανάληψη της γ) χημειοθεραπείας για αρκετούς μήνες. Η κλασική αντιμετώπιση του σαρκώματος Ewing περιελάμβανε στο παρελθόν χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία κυρίως, με τη χειρουργική εκτομή να επιφυλάσσεται για τα οστά εκείνα που η εξαίρεσή τους δεν απαιτούσε ιδιαίτερες τεχνικές ανακατασκευής και η απώλειά τους δεν προκαλούσε ιδιαίτερη λειτουργική αναπηρία [147]. Οι νέες τάσεις όμως είναι να χειρουργούνται όλοι οι όγκοι εκείνοι για τους οποίους ο χειρουργός νιώθει βέβαιος ότι μπορεί να εξαιρεθούν πλήρως.

Πολλές αναδρομικές μελέτες έχουν αποδείξει μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών που αντιμετωπίστηκαν με χειρουργική αφαίρεση του όγκου τους αντί ακτινοθεραπείας. Μια μελέτη από τη Mayo clinic ανέφερε 5-ετή επιβίωση στο 76% των ασθενών που χειρουργήθηκαν για την αρχική τους εστία, σε αντίθεση με το 34% εκείνων που έλαβαν μόνο ακτινοθεραπεία για τοπικό έλεγχο της νόσου [55]. Μια άλλη μελέτη από το Massachusetts General Hospital έδειξε 5-τη επιβίωση στο 92% και 37% των ασθενών που έλαβαν ή όχι χειρουργική θεραπεία αντίστοιχα [148]. Αυτή η διαφορά γίνεται ιδιαίτερα αισθητή για βλάβες της περιοχής της λεκάνης. Μία πιθανή εξήγηση για την υπεροχή της χειρουργικής θεραπείας προς την επιβίωση, είναι ότι η εξαίρεση του όγκου απομακρύνει κλώνους καρκινικών κυττάρων που μπορεί να είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία, πριν τους δοθεί η ευκαιρία να υποτροπιάσουν τοπικά ή να δώσουν μεταστάσεις. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιβίωσης με τη χειρουργική θεραπεία ή συνδυασμού χειρουργικής και ακτινοθεραπείας σε σχέση με μόνη την ακτινοθεραπεία, γίνονται αισθητά κυρίως μετά την 5-ετία αφού δεν είναι ασύνηθες να εμφανιστεί όψιμη υποτροπή τοπικά μετά από ακτινοθεραπεία [149]. Ο Bacci και συν.[2] ανέφερε 36% τοπική υποτροπή μετά από ακτινοθεραπεία ως μόνη μέθοδο για τοπική θεραπεία εκ των οποίων το 14% εμφανίστηκε 4 χρόνια μετά τη λήξη της θεραπείας των ασθενών αυτών στο ινστιτούτο Rizzoli. Η συνολική επιβίωση ήταν σαφώς ανώτερη σ' εκείνους που έλαβαν χειρουργική θεραπεία.

Η σύγχρονη φιλοσοφία για την αντιμετώπιση του Ewing είναι η χρήση neo-adjuvant χημειοθεραπείας για να συρρικνωθεί ο όγκος και στη συνέχεια en-block ευρεία χειρουργική εκτομή για τα οστά που προαναφέρθηκαν, ώστε να αποφευχθεί η ανθεκτική στη χημειοθεραπεία όψιμη υποτροπή του [11]. Δεν είναι εύκολο να τεθούν πάντα οι απόλυτες ενδείξεις αφαίρεσης του όγκου αλλά κάποιες γενικές οδηγίες ισχύουν: πρώτα απ' όλα η θεραπεία πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με την εντόπιση, το μέγεθος και τη σταδιοποίηση του όγκου. Για τη σταδιοποίηση του Ewing ισχύουν οι βασικές αρχές που τέθηκαν από τον Enneking και απεικονίζονται στον πίνακα 2 [150]. Το σάρκωμα Ewing θεωρείται όγκος υψηλής κακοήθειας και κατά τη διάγνωση είναι συνήθως ήδη εξωδιαμερισματικό (II B) ενώ σε ποσοστό 15-28% συνυπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις κυρίως στους πνεύμονες (III A, III B) [104,105]. Η προσέγγιση του ασθενούς πρέπει να γίνεται από ομάδα ειδικών που να περιλαμβάνει ογκολόγο, ακτινοθεραπευτή ογκολόγο και ορθοπεδικό ογκολόγο καθώς και ειδικό για την αποκατάσταση. Ο έλεγχος της τοπικής νόσου δεν πρέπει να προηγείται ή να παρεμβάλλεται στη συστηματική χημειοθεραπεία. Χειρουργική αφαίρεση του όγκου πρέπει να επιχειρείται οποτεδήποτε ο χειρουργός νιώθει ότι η αρχική εστία μπορεί να εξαιρεθεί ολοκληρωτικά, ιδιαίτερα σε οστά που η πλήρης αφαίρεσή τους δεν θα επηρέαζε το λειτουργικό αποτέλεσμα ή που η ανακατασκευή τους δεν θα ήταν προβληματική. Εάν η ευρεία εκτομή του όγκου δεν είναι δυνατή ή η χειρουργική

αφαίρεση δεν είναι πλήρης ($< 1\text{cm}$ υγιούς ιστού περιφερικά), τότε προστίθεται ακτινοθεραπεία στο σχήμα [151]. Είναι σημαντικό να αποφεύγονται κατά το δυνατόν πολύπλοκες χειρουργικές ανακατασκευές των οστών οι οποίες μπορεί να καθυστερήσουν την έναρξη της μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας” εναλλακτικά όλη η χημειοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί προεγχειρητικά.

Πίνακας 2. Η σταδιοποίηση των σαρκωμάτων κατά Enneking

I. Χαμηλής κακοήθειας χωρίς μεταστάσεις

- A. Ενδοδιαμερισματικό
- B. Εξωδιαμερισματικό

II. Υψηλής κακοήθειας χωρίς μεταστάσεις

- A. Ενδοδιαμερισματικό
- B. Εξωδιαμερισματικό

III. Χαμηλής ή Υψηλής κακοήθειας με μεταστάσεις

- A. Ενδοδιαμερισματικό
- B. Εξωδιαμερισματικό

Ακτινοθεραπεία

Ενδείξεις για ακτινοθεραπευτική αγωγή αποτελούν : α) Χειρουργικά απροσπέλαστη περιοχή, β) Βλάβη για την οποία η ακτινοβολία θα προκαλούσε σαφώς μικρότερη νοσηρότητα από την ευρεία χειρουργική εκτομή και γ) Φτωχή πρόγνωση π.χ. νόσος σταδίου III με πολλαπλές σκελετικές μεταστάσεις, απομακρυσμένες μεταστάσεις και μη ικανοποιητική απάντηση στη χημειοθεραπεία.

Η ακτινοθεραπευτική αγωγή πρέπει να δίνεται σε δόσεις 180 έως 200 cGy πέντε ημέρες την εβδομάδα. Διακοπές στη θεραπεία καλό είναι να αποφεύγονται όταν αυτό είναι δυνατό.

Από τη στιγμή που η μεγαλύτερη μάζα μαλακών μορίων του όγκου θα συρρικνωθεί με την αρχική χημειοθεραπεία, η χρήση αξονικής τομογραφίας για τον ακριβή καθορισμό του οστικού όγκου μπορεί να δώσει το πλεονέκτημα στον ακτινοθεραπευτή να “βομβαρδίσει” το οστόν σε περιορισμένη έκταση. Μια μελέτη του POG δεν βρήκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον τοπικό έλεγχο της νόσου όταν όλο το οστόν περιλαμβάνονταν στο πεδίο, απ’ ότι όταν ένα συγκεκριμένο, περιορισμένης έκτασης οστικό πεδίο και τα περιβάλλοντα μαλακά μόρια με ένα όριο υγιούς ιστού 2cm γύρω από τη βλάβη όπως αυτή είχε εκτιμηθεί πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας, ακτινοβολούνταν [152].

Οι κλασσικές προτεινόμενες δόσεις αφορούν 4000-4500 cGy στο σύνολο του οστού με μια μέγιστη επικεντρωμένη δόση 5000-6000 cGy στην εστία του όγκου. Όταν δόσεις μικρότερες των 4.500 cGy έχουν συσχετιστεί με μικρότερα ποσοστά ελέγχου της τοπικής νόσου [153], υπάρχει διχογνωμία για δόσεις μεταξύ 4500 και 6000 cGy ή άνω

των 6000 cGy για όγκους μεγάλου μεγέθους [154]. Μια έρευνα στο St.Jude Children's Research Hospital έδειξε ότι δόσεις μικρότερες των 3500 cGy έδωσαν υποσχόμενα αποτελέσματα για πρωτοπαθείς εστίες μικρότερες των 8cm και με μικροσκοπικά μόνο ανιχνεύσιμη νόσο μετά την αρχική χημειοθεραπεία. [155]. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την ποικιλία απόψεων πιθανότατα είναι η ακρίβεια εκτίμησης του αρχικού όγκου κατά τη στιγμή της μετέπειτα συστηματικής υποτροπής. Οι περισσότεροι πάντως μελετητές συμφωνούν ότι ο αριθμός των επιπλοκών αυξάνεται σημαντικά με δόσεις άνω των 4500 cGy [156] με τις δευτεροπαθείς κακοήθειες να εμφανίζονται σε ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα όταν οι δόσεις είναι ίσες ή άνω των 6000 cGy [157]. Παρόλα αυτά, για τους ασθενείς εκείνους που βρίσκονται στο στάδιο III, η ολοσωματική ακτινοβολία με ταυτόχρονη μεταμόσχευση μυελού των οστών είναι μία από τις σύγχρονα εφαρμοζόμενες θεραπείες. Είναι σημαντικό να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος των παθολογικών καταγμάτων ιδιαίτερα στις περιοχές της βιοψίας, μετά από την ακτινοβολία, για αυτό είναι απαραίτητο αυτές να ταμπονάρονται με βιολογικό τσιμέντο, ή να σταθεροποιούνται με συσκευές εσωτερικής οστεοσύνθεσης όταν βρίσκονται σε περιοχές υψηλού κινδύνου. Η ακτινοβολία μειώνει τη φυσική αντοχή του οστού κατά 50% αυξάνοντας κατά πολύ τον κίνδυνο του παθολογικού κατάγματος που θα επηρέαζε δυσμενώς την πρόγνωση.

Με την πρόοδο των θεραπευτικών μέσων σήμερα και τη μακρότερη γενικά επιβίωση των ασθενών αυτών, οι επιπλοκές ιδιαίτερα της ακτινοθεραπείας έγιναν πιο εμφανείς. Οι επιπλοκές αυτές είναι συχνότερες και πιο σημαντικές στους σκελετικά ανώριμους ασθενείς και περιλαμβάνουν ανισοσκελία από βλάβη στον αυξητικό χόνδρο, δυσκαμψία αρθρώσεων, μυϊκή ατροφία και παθολογικά κατάγματα όπως προαναφέρθηκε [158]. Τα μισά από αυτά τα κατάγματα θα πωρωθούν αν και αργά, ενώ τα υπόλοιπα θα χρειαστούν κάποια μέθοδο εσωτερικής οστεοσύνθεσης και μοσχεύματα, συχνότατα αγγειούμενα για να προωθηθεί η πώρωση. Δευτεροπαθείς όγκοι όπως καρκίνος του μαστού, σαρκώματα μαλακών μορίων ή οστών και καρκίνος του δέρματος και του θυρεοειδούς αποτελούν μια από τις σημαντικότερες επιπλοκές, με τα 2/3 αυτών να αναπτύσσονται στις περιοχές της ακτινοβολήσης. Σε αντίθεση με τον κίνδυνο της δευτεροπαθούς λευχαιμίας που μειώνεται μετά τη δεκαετία, ο κίνδυνος για συμπαγείς όγκους όπως τα σαρκώματα, που αποτελούν τις συχνότερες δευτεροπαθείς κακοήθειες μετά από ακτινοθεραπεία [159], αυξάνεται με το χρόνο. Ο Tucker και συν.[157] μετά από έρευνα σε 649 παιδιά που αντιμετωπίστηκαν με ακτινοβολία, απέδειξε την αυξημένη συχνότητα δευτεροπαθών σαρκωμάτων με την πάροδο του χρόνου και ανέφερε ποσοστά μέχρι 22%, μικρότερα μόνο από εκείνα του ρετινοβλαστώματος. Γενικά ο συνδυασμός χειρουργικής και ακτινοθεραπείας επιτρέπει δόση μικρότερη των 45Gy, που ελαχιστοποιεί τις επιπλοκές της ακτινοβολίας.

Χειρουργική θεραπεία

Έχει ήδη αναφερθεί ότι το σάρκωμα Ewing είναι όγκος υψηλής κακοήθειας και με βάση την ταξινόμηση κατά Enneking, εμπίπτει συνήθως στο στάδιο IIB ή III. Οι σύγχρονες απόψεις είναι να επιχειρείται χειρουργική αφαίρεση οποτεδήποτε ο χειρουργός νιώθει ότι μπορεί να εξαιρέσει τον όγκο στο σύνολό του.

Οι αρχές χειρουργικής του αντιμετώπισης εξαρτώνται από την εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας. Βλάβες στα μακρά οστά υπόκεινται συνήθως σε ευρεία χειρουργική εκτομή (που διατηρεί το μέλος) και ανακατασκευή του οστού. Εάν προστεθεί ακτινοβολία στο σχήμα τότε οι μεταλλικές προθέσεις προσφέρουν πιο ασφαλή αποκατάσταση της ανατομίας από ότι τα αλλομοσχεύματα, πάντα σε σχέση με την εντόπιση της εστίας βέβαια. Μεγάλα πτωματικά μοσχεύματα μακρών οστών μπορεί

να οδηγήσουν σε καθυστερημένη ή μη πώρωση στο σημείο επαφής τους με το ενδογενές οστόν, γι αυτό συνήθως συνδυάζονται με αγγειούμενα μοσχεύματα περόνης [160]. Στους περισσότερους ασθενείς η διατήρηση του μέλους είναι δυνατή, αλλά ο ακρωτηριασμός κάποιες φορές θεωρείται απαραίτητος, όταν για παράδειγμα ο όγκος είναι πολύ μεγάλος, όταν εμφανιστεί παθολογικό κάταγμα που δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί διαφορετικά ή όταν η βλάβη αφορά το κάτω πέρας του μηριαίου σε πολύ μικρό παιδί.

Το 5-10% των ασθενών που υφίστανται παθολογικό κάταγμα αποτελούν ένα ιδιαίτερη πρόκληση [161]. Τα καρκινικά κύτταρα διασπείρονται μέσα στο αιμάτωμα το μέγεθος του οποίου εξαρτάται από την παρεκτόπιση του κατάγματος. Η διάσωση του μέλους σ' αυτή την περίπτωση γίνεται προβληματική. Συχνά το κάταγμα μπορεί να ακινητοποιηθεί σε γύψο ή με εξωτερική οστεοσύνθεση, ενώ ο ασθενής εξακολουθεί τη χημειοθεραπεία του που προωθεί την πώρωση. Μαγνητικές τομογραφίες είναι απαραίτητες πριν και μετά τη χημειοθεραπεία. Ενώ στην περίπτωση του οστεοσαρκώματος ο χειρουργός πρέπει να αφαιρέσει όλες τις ανατομικές περιοχές που έχουν επηρεαστεί από καρκινικά κύτταρα, στο σάρκωμα Ewing είναι δυνατή η αποστείρωση της περιοχής με εξωτερική ακτινοβολία, μετά από μια πιο συντηρητική εξαίρεση. Προβλήματα επίσης αφορούν και την εντόπιση του όγκου όπως ειπώθηκε, σε περιοχές όπως η λεκάνη, η σπονδυλική στήλη και το εγγύς μηριαίο.

Λεκάνη

Πρωτοπαθείς εστίες σαρκώματος Ewing στη λεκάνη αποτελούν ιδιαίτερο πρόβλημα λόγω του μεγάλου μεγέθους συνήθως του όγκου και της πολύπλοκης ανατομίας της περιοχής [162]. Η πρόγνωση σ' αυτή την περίπτωση είναι φτωχή. Η ακτινοθεραπεία δεν είναι απόλυτα αποτελεσματική για τον τοπικό έλεγχο της νόσου αλλά και η χειρουργική αντιμετώπιση δεν έχει ευρεία αποδοχή. Αφαίρεση ολοκλήρου του όγκου έχει θετική πρόγνωση όσον αφορά τον έλεγχο τοπικά, την επιβίωση ελεύθερας νόσου και απαλλάσσει από την πιθανότητα δευτεροπαθών μετά-ακτινοθεραπείας όγκων. Στη μελέτη του Massachusetts General Hospital δεν υπήρξε στατιστικά καλύτερη πρόγνωση μετά χειρουργική εκτομή του όγκου, αλλά άλλες σειρές αναφέρουν καλύτερα αποτελέσματα με τη συμμετοχή χειρουργικής θεραπείας [2,163]. Στη σειρά της Mayo clinic, 29% των ασθενών με σάρκωμα Ewing σε περίοδο 15 ετών, είχαν πρωτοπαθή βλάβη που αφορούσε τη λεκάνη [164]. Είκοσι επτά ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες με βάση το πρωτόκολλο θεραπείας της τοπικής νόσου και την ύπαρξη ή μη μεταστάσεων κατά την αρχική διάγνωση. Το συμπέρασμα ήταν ότι οι ασθενείς που χειρουργήθηκαν παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης και μικρότερο τοπικής υποτροπής. Παρόλα αυτά το θέμα της χειρουργικής αντιμετώπισης όγκων της λεκάνης παραμένει διφορούμενο και η υπολειπόμενη αναπηρία που προκαλεί πρέπει να αντισταχθεί στον κίνδυνο τοπικής υποτροπής και δευτεροπαθών κακοηθειών που παρουσιάζει η ακτινοθεραπεία.

Εγγύς μηριαίο

Το εγγύς μηριαίο αποτελεί μια άλλη περιοχή εντόπισης με ιδιαίτερα προβλήματα. Υπάρχει ακόμη ασυμφωνία για τον καλύτερο τρόπο επίτευξης ελέγχου τοπικά και η μακροβιότητα των πολύπλοκων τεχνικών ανακατασκευής του οστού δεν είναι γνωστή ακόμη. Σήμερα, οι δύο πιο δημοφιλείς τεχνικές αναδόμησης (reconstruction) του οστού είναι η αντικατάστασή του με μεγάλες ενδοπροθέσεις ή η χρήση πτωματικών αλλομοσχευμάτων συνήθως μαζί με ελεύθερα αγγειούμενα μοσχεύματα περόνης. Τα

αποτελέσματα αυτών των πολύπλοκων χειρουργικών τεχνικών πρέπει να συγκριθούν με τα αντίστοιχα της συμβατικής ακτινοθεραπείας. Μια αναδρομική μελέτη 16 ασθενών με σάρκωμα Ewing του εγγύς μηριαίου που έλαβαν σύγχρονα σχήματα χημειοθεραπείας δημοσιεύτηκε πρόσφατα. Οι περισσότεροι ήταν αγόρια με μέση ηλικία 15 ετών. Οι 14 έλαβαν μόνο ακτινοβολία για τον έλεγχο της τοπικής νόσου. Παθολογικό κατάγμα εμφανίσε το 80% εκτός από 2 στους οποίους έγινε εσωτερική σταθεροποίηση προφυλακτικά. Λόγοι για την πρώιμη εμφάνιση κατάγματος ήταν η εκτεταμένη κατάληψη του οστού από καρκινικά κύτταρα, τεχνικά σφάλματα κατά τη βιοψία και μη συνεργάσιμοι ασθενείς όσον αφορούσε την αποφυγή φόρτισης. Κατά την όψιμη εμφάνιση της επιπλοκής (οι αριθμοί ήταν ίδιοι), ο βασικός παράγοντας ήταν η νέκρωση του οστού από την ακτινοβολία. Το συμπέρασμα είναι ότι η ιδιαιτερότητα της λειτουργικής ανατομικής του εγγύς μηριαίου ήταν ο βασικός λόγος που οδήγησε στην εμφάνιση παθολογικών καταγμάτων μετά ακτινοθεραπεία και όπως ειπώθηκε ο ίδιος λόγος καθιστά τις τεχνικές ανακατασκευής του οστού αφερέγγυες [161]. Η τρέχουσα πρακτική είναι neo-adjuvant chemotherapy και ευρεία χειρουργική εκτομή με ανακατασκευή του οστού ή προφυλακτική ενδομυελική ήλωση μετά τη συμπλήρωση και της ακτινοβολίας.

Σπονδυλική στήλη

Ευτυχώς μόνο ένα 3.5% των Ewing εμφανίζονται στη Σ.Σ και το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 1% εάν εξαιρεθεί το ιερό [156]. Η μεταστατική όμως νόσος είναι πολύ συχνότερη, κυρίως στα τελικά στάδια. Σε μια αναδρομική μελέτη 36 ασθενών με σάρκωμα Ewing της ΣΣ το 58% αυτών παρουσιάστηκε με νευρολογικά σημεία [56]. Η πιο συχνή εντόπιση ήταν στην οσφυϊκή και στην οσφυοιερή περιοχή. Η θεραπεία τους περιέλαβε χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Από αυτούς με νευρολογική συμπτωματολογία, η πλειονότητα βελτιώθηκε μετά χειρουργική πεταλεκτομή. Η 5-ετής επιβίωση ήταν 33% και δεν υπήρξε διαφορά στην πρόγνωση εάν η πρωτοπαθής εστία αφορούσε το ιερό οστό ή την υπόλοιπη ΣΣ, ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν χειρότερη πρόγνωση για το ιερό. Ο όγκος υποτροπίασε τοπικά στους μισούς αρρώστους.

Οι επεμβάσεις που αφορούν την εντόπιση της βλάβης στη ΣΣ γίνονται συνήθως σε περισσότερα από ένα στάδια για αυτό και η τρέχουσα τάση είναι να συμπληρώνεται η χημειο- και ακτινοθεραπεία προεγχειρητικά, ώστε η ανάνηψη και ακόμη οι επιπλοκές μετεγχειρητικά να μην επηρεάζουν τη συστηματική θεραπεία.

Με την πρόοδο των θεραπευτικών σχημάτων σήμερα, η μακρά επιβίωση των ασθενών με σάρκωμα Ewing φτάνει το 70%. Προβληματική παραμένει ωστόσο η αντιμετώπιση της μεταστατικής ή υποτροπιάζουσας νόσου όπου η επιβίωση είναι αισθητά μικρότερη [151].

Μεταστατικό σάρκωμα Ewing

Το σάρκωμα Ewing είναι όγκος υψηλής κακοήθειας και τείνει να δίνει μεταστάσεις νωρίς. Κατά την αρχική διάγνωση, 15-28% των ασθενών παρουσιάζουν ήδη μεταστάσεις. Οι πιο συχνή εντόπιση είναι στους πνεύμονες (αμφοτερόπλευρα στο 60%), στα οστά και στο μυελό των οστών. Στη μεγαλύτερη μέχρι σήμερα δημοσιευθείσα μελέτη [165], το 30% των μεταστάσεων αφορούσε τους πνεύμονες αποκλειστικά, το άλλο 30% το μυελό και τα οστά και ένα 20% συνδυάζε πνευμονικές με οστικές εντοπίσεις. Όσον αφορά την τοπική νόσο, πρωτοπαθείς εστίες στην πύελο και το μηριαίο τείνουν να έχουν μεγαλύτερη τάση για να δώσουν μεταστάσεις. Μια πρόσφατη

αναθεώρηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας ανέφερε την πύελο ως εστία της πρωτοπαθούς βλάβης στο 32% (17-59%) της μεταστατικής νόσου και τα μακρά οστά στο 32% (17-35%) επίσης [166]. Οι πνεύμονες ήταν η μόνη εστία στο 56% και τα οστά/μυελός των οστών στο 50%.

Προγνωστικοί δείκτες

Γενικά η εξαγωγή συμπερασμάτων δεν είναι ασφαλής λόγω του μικρού αριθμού περιστατικών, στις επίσης λίγες δημοσιευθείσες μελέτες για τη το μεταστατικό Ewing.

Η ηλικία αναφέρθηκε ότι επηρεάζει την πρόγνωση, σ' όλες τις μελέτες του IESS (≤ 10 ετών, 40% συνολική επιβίωση, > 10 ετών, 20% συνολική επιβίωση). Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι στις μελέτες αυτές βρέθηκε οι ασθενείς της πρώτης ομάδας να εμφάνιζαν εντόπιση πρωτοπαθούς εστίας στις πλευρές, που είναι γνωστό ότι έχει καλύτερη πρόγνωση, σε αρκετά μεγαλύτερο ποσοστό από τους υπόλοιπους (39% έναντι 16%). Μόνο 4/29 και 5/19 με πρωτοπαθή εστία στην πύελο και μυελό των οστών αντίστοιχα, επιβίωσαν.

Στη μελέτη του St. Jude, ούτε η πρωτοπαθής, ούτε η εντόπιση των μεταστάσεων βρέθηκε να επηρεάζει το αποτέλεσμα, αλλά κανένα από τα παιδιά με πολλαπλές μεταστάσεις δεν επέζησε. Η μελέτη του EICISS ανέφερε την αμφοτερόπλευρη εντόπιση και τη φτωχή απάντηση στην αρχική χημειοθεραπεία ως κακούς προγνωστικούς παράγοντες.

Ο χρόνος καθώς και η φύση της τοπικής θεραπείας είναι σημαντικοί δείκτες. Η ένταση της χημειοθεραπείας πρέπει να είναι μεγάλη κατά τις πρώτες εβδομάδες της έναρξης και αν η ακτινοβολήση ή το χειρουργείο γίνουν πολύ νωρίς, αυτό θα επηρεάσει ενδεχομένως τη χρήση κατάλληλων X/Θ σχημάτων. Ακόμη είναι γενικά αποδεκτό πως κάθε επέμβαση πρέπει να αναβληθεί μέχρι να επιτευχθεί η μέγιστη απάντηση στη συστηματική θεραπεία.

Η ακτινοβολήση των πνευμονικών πεδίων φαίνεται να ευνοεί την πρόγνωση, αλλά απουσιάζουν ακόμη ασφαλή στοιχεία. Η τρέχουσα τάση είναι να ακτινοβολούνται και τα δύο πνευμονικά πεδία σ' αυτούς που παρουσιάζουν μεταστάσεις στους πνεύμονες, με μόνη ίσως εξαίρεση τα μικρά παιδιά που απάντησαν θεαματικά στην αρχική χημειοθεραπεία [166]. Για τη χρήση της Μεγαθεραπείας δεν υπάρχουν ακόμη μεγάλοι αριθμοί ασθενών για την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων.

Όσον αφορά το είδος της χημειοθεραπείας, αυτή μπορεί να διακριθεί σε τρεις ομάδες: α) αυτή που χρησιμοποιεί κλασσικές δόσεις AdVAC, β) αυτές που εφαρμόζουν μεγαλύτερες δόσεις αλκυλιωτικών παραγόντων και γ) αυτές που περιλαμβάνουν πολυπαραγοντικά, μεγάλης δοσολογίας φάρμακα. Τα αποτελέσματα της θεραπείας με το πρώτο σχήμα ήταν απογοητευτικά. Η χρήση υψηλών δόσεων cyclophosphamide και η σμίκρυνση των μεσοδιαστημάτων φαίνεται να έχει ευνοϊκή επίδραση αλλά είναι ακόμη νωρίς. Η έρευνα για την τρίτη ομάδα [κυρίως Melphalan-based, σε συνδυασμό με Busulphan, Etoposide, ή 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosurea (BCNU)] συνήθως σε συνδυασμό με τη χρήση GCSF είναι σε αρχικό στάδιο ακόμη.

Υποτροπιάζουσα νόσος σαρκόματος Ewing.

Αν και με την πρόοδο των μέσων καταπολέμησης της τοπικής νόσου καθώς και την ανάπτυξη σύγχρονων, πολυπαραγοντικών μέσων χημειοθεραπείας μεγάλης έντασης, τα ποσοστά υποτροπής του σαρκόματος Ewing έχουν σημαντικά μειωθεί, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών εμπίπτει ακόμη στην κατηγορία αυτή [167]. Τα ποσοστά μακράς

επιβίωσης μετά την υποτροπή είναι μικρότερα του 20-25% [168]. Μια πρόσφατα δημοσιευμένη αναθεώρηση των πρωτόκολλων θεραπείας ES-79, ES-87 και ES-92 τα τελευταία 20 χρόνια από το St. Jude Children's Research Hospital οδήγησε στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων [168].

Ο σημαντικότερος ίσως προγνωστικός παράγοντας βρέθηκε να είναι ο χρόνος εμφάνισης της υποτροπής μετά την αρχική θεραπεία. Ασθενείς που υποτροπίασαν σε διάστημα μικρότερο των δύο ετών είχαν σημαντικά μικρότερη επιβίωση από εκείνους που εμφάνισαν υποτροπή μετά τα 2 χρόνια. Μετά τα δύο χρόνια η επιβίωση δε φάνηκε να επηρεάζεται αισθητά αφού ήταν παρόμοια σ' αυτούς που την εμφάνισαν μετά τα 4,5 ή 6 χρόνια.

Η περιοχή εμφάνισης της υποτροπής ήταν επίσης σημαντική για την επιβίωση, αφού απομακρυσμένες ή τοπικές σε συνδυασμό με απομακρυσμένες εστίες, είχαν σαφώς χειρότερη πρόγνωση από την τοπική μόνο υποτροπή όπως είχε υποστηριχθεί και στο παρελθόν από άλλους ερευνητές [169].

Οι υποτροπιάζουσες εστίες αφορούσαν τους πνεύμονες και τα οστά σε ποσοστό άνω του 50% [8] και οι ασθενείς που εμφάνισαν υποτροπή αποκλειστικά και μόνο στους πνεύμονες είχαν μακρότερη επιβίωση από τους υπολοίπους, όπως έχει διαπιστωθεί και για τη μεταστατική νόσο. Στην περίπτωση αυτή η ακτινοβολία και των δύο πνευμονικών πεδίων φάνηκε να έχει ευεργετικά αποτελέσματα.

Η παρουσία μεταστάσεων κατά την αρχική διάγνωση φάνηκε να επηρεάζει και το χρόνο εμφάνισης της υποτροπής και τον τύπο της (τοπική ή απομακρυσμένη ή συνδυασμός των δύο), με απώτερη αρνητική επίδραση στην συνολική επιβίωση.

Σημαντική ήταν επίσης η θετική συμβολή της χειρουργικής θεραπείας για την ελάττωση του ποσοστού τοπικής υποτροπής, αφού ασθενείς που έλαβαν αποκλειστικά ακτινοθεραπεία υποτροπίασαν σε ποσοστό 30-35%, ενώ εκείνοι που χειρουργήθηκαν σε συνδυασμό ή όχι με ακτινοβολία) παρουσίασαν τοπική υποτροπή μόνο στο 10% [170,171]. Ριζική χειρουργική θεραπεία πρέπει λοιπόν να υιοθετείται σ' όλους τους ασθενείς που παρουσιάζουν τοπική υποτροπή.

Η δόση της ακτινοβολίας φαίνεται να παίζει ρόλο μόνο όταν αυτή είναι μικρότερη από 35Gy ενώ μετά τα 45Gy η σχέση δόσης-απάντησης δε φαίνεται να αλλάζει [172]. Έχει αναφερθεί ήδη ότι η χορήγηση μικρών δόσεων ακτινοβολίας μετά το χειρουργείο δίνει καλά αποτελέσματα και φαίνεται ότι επίσης ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο υποτροπής όταν τα όρια της χειρουργικής εκτομής δεν είναι ασφαλή [13].

Η συστηματική αρχική χημειοθεραπεία φαίνεται να προσφέρει τα μέγιστα στην έλεγχο και της τοπικής νόσου και στην μακρά επιβίωση. Σχήματα που χρησιμοποίησαν Doxorubicin, intensified chemotherapy, και Ifosfamide/Etoposide [145], ευνόησαν σημαντικά στην πρόγνωση. Ακόμη η χρήση της μεγάλης έντασης X/Θ σε συνδυασμό με GCSF έδωσε καλά αποτελέσματα αλλά ο ρόλος του δεύτερου ως ανεξάρτητου παράγοντα ευνοϊκού για την πρόγνωση δεν έχει διευκρινιστεί [173]. Ο συνδυασμός topotecan - cyclophosphamide δίνει καλά αποτελέσματα σε ποσοστό 35% των ασθενών με υποτροπιάζων σάρκωμα Ewing και είναι μια υποσχόμενη θεραπεία για το μέλλον [174]. Μεγάλης έντασης, πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία και επιθετικά μέτρα ελέγχου της τοπικής νόσου, έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα στο υποτροπιάζων σάρκωμα Ewing.

Παράγοντες τέλος, όπως το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, το αρχικό σχήμα ακτινοθεραπείας, το γένος, η αρχική εντόπιση της εστίας, η ηλικία κατά τη διάγνωση και το αποτέλεσμα της χειρουργικής αφαίρεσης (αρνητικά ή θετικά όρια κατά την εξαίρεση) δε φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά την πρόγνωση [168].

Νέοι ορίζοντες θεραπείας

Η πρόοδος των μεθόδων θεραπείας του σαρκώματος Ewing την τελευταία 20-ετία, έχει βελτιώσει σημαντικά την πρόγνωσή του που για τον πρωτοπαθή μη-μεταστατικό όγκο, η 5-ετής ελευθέρας νόσου επιβίωση, ξεπερνά σήμερα το 70%. Η μεταστατική όμως νόσος και η υποτροπή του παραμένουν ακόμη δύσλυτα προβλήματα. Το 90% των μεταστατικών όγκων θα απαντήσει στα βασικά σχήματα χημειοθεραπείας αλλά η τελική πρόγνωση για τη μακρά επιβίωση δεν είναι καθόλου ευνοϊκή [175]. Πρωτοπαθείς ή υποτροπιάζοντες όγκοι που δεν απαντούν στη συμβατική Χ/Θ αποτελούν ιδιαίτερο πρόβλημα. Για τους λόγους αυτούς η έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και στρατηγικών αντιμετώπισης είναι απαραίτητη.

Αφού τα σαρκώματα Ewing πρέπει να θεωρούνται ως συστηματική νόσος ακόμη κι όταν οι μεταστατικές εστίες κατά τη διάγνωση βρίσκονται κάτω από το διαγνωστικό όριο με τις σύγχρονες τεχνικές σήμερα, η έρευνα για ανοσολογικές στρατηγικές αντιμετώπισης είναι θεμιτή. Κάποιες μέθοδοι μεταμόσχευσης ετερόλογων πρωτογενών κυττάρων του αιμοποιητικού έχουν ανακοινωθεί αλλά τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα [176]. Πρόσφατα επιτεύχθηκε καταστροφή καρκινικών κυττάρων του Ewing σε καλλιέργειες και σε πειραματόζωα, μετά από δέσμευση του αντιγόνου CD99 από αυτά [177,178]. Το CD99 εκφράζεται στα κύτταρα του αιμοποιητικού και υπέρ-εκφράζεται στα κύτταρα όχι μόνο του σαρκώματος Ewing αλλά και στα T-λεμφοκύτταρα του ανθρώπου. Η δέσμευση λοιπόν του αντιγόνου από τα κύτταρα του όγκου, μπορεί να οδηγήσει τα λεμφοκύτταρα εναντίον τους.

Άλλες ανοσολογικές έρευνες επιστρατεύουν τεχνικές εμβολιασμού του όγκου. Μια μελέτη φάσης II του National Cancer Institute στις ΗΠΑ [179], χρησιμοποίησε αυτόλογα T-λεμφοκύτταρα ευαισθητοποιημένα σε αντιγόνα καρκινικών κυττάρων. Η χρήση κυτταροκινών είναι υπό μελέτη επίσης. Η ιντερλευκίνη-2 μελετάται σε ειδικές περιπτώσεις π.χ μετά υψηλής -δόσης θεραπεία [176], η ιντερφερόνη - β πυροδοτεί in-Vitro απόπτωση καρκινικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του συστήματος κασπάσης [180]. Το μπετουλινικό οξύ πυροδοτεί την απόπτωση με άμεση μιτοχονδριακή απελευθέρωση διαλυτών αποπτωγενετικών παραγόντων και μπορεί πιθανόν να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα που άλλως είναι ανθεκτικά, σε κυτταροστατικούς παράγοντες όπως είναι η Doxorubicin [181].

Ο Insulin – like growth factor-1 receptor (IGF-1R), που συμμετέχει στην κυτταρική μεταλλαγή, ανάπτυξη και επιβίωση, είναι απαραίτητος για την μεταλλαγή ινοβλαστών ποντικού μέσω της οδού του EWS/FLI-1 γονιδίου. Αναστολή του PI 3-K, ενός ενζύμου απαραίτητου για την ενεργοποίηση του IGF-1R, αυξάνει το ρυθμό απόπτωσης, που προκαλείται από τη doxorubicin στα κύτταρα του σαρκώματος Ewing [182]. Ομοίως η λοβαστατίνη (lovastatin) και η τυναμυσίνη (tynamycin), ένζυμα που δρουν στον IGF-1R, προκαλούν την έναρξη απόπτωσης στα κύτταρα του Ewing [183,184].

Απόπτωση επίσης για τα κύτταρα του Ewing έχει πυροδοτηθεί μέσω αναστολέων των μεταλοπρωτεϊνών που αποκολλούν το Fas-ligand από την επιφάνεια των κυττάρων. Το fas-ligand έχει ενεργό ρόλο στην απόπτωση μέσω Doxorubicin και έτσι οι αναστολές των μεταλοπρωτεϊνών μπορεί να αυξήσουν τη δράση της τελευταίας [185]. Τα κύτταρα του όγκου εκφράζουν επίσης το c-kit που φαίνεται να προσκολλάται στην επιφάνεια κυττάρων του αιμοποιητικού και να λειτουργεί χημειοτακτικά για τα κύτταρα του Ewing. Η καταστολή επομένως του παράγοντα αυτού μπορεί να μειώσει τις μεταστατικές ιδιότητες των κυττάρων του όγκου [186]. Ο παράγοντας BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) με κριτικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση μέσω ελέγχου του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης,

προκάλεσε μείωση του αριθμού και πυροδότησε απόπτωση σε κύτταρα σαρκώματος Ewing σε ποντίκια [187].

Η αμφοστίνη (WR-2721) είναι ένα φάρμακο που αναπτύχθηκε ως ακτινο- και χημειοπροστατευτικό και χορηγείται σε ασθενείς που λαμβάνουν Cyclophosphamide και Ifosphamide στη μελέτη του POG 9457, αλλά τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής αναμένονται [188]. Η Docetaxel βρέθηκε να είναι δραστική σε 4 από τους 5 ασθενείς με αθεράπευτο σάρκωμα μαλακών μορίων [189]. Πρώιμες μελέτες για τις ταξάνες (docetaxel, paclitaxel), σε ανθεκτικούς ή υποτροπιάζοντες συμπαγείς όγκους είναι σε εξέλιξη αλλά δεν υπάρχουν ακόμη κλινικά συμπεράσματα [190]. Οι αναστολείς της DNA τοποισομεράσης όπως η Topotecan δείχνουν δραστηριότητα σε ανθεκτικούς ή υποτροπιάζοντες όγκους και μελετούνται επίσης προς το παρόν [191]. Η κλιμάκωση της δοσολογίας της ανθρακυκλίνης μέσω λιποσωματικών παραλλαγών είναι μια υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση και μια ανάλογη μελέτη έχει πρόσφατα ξεκινήσει [192].

ΜΕΡΟΣ

ΔΕΥΤΕΡΟ

Απόπτωση

Εισαγωγή

Η ανανέωση των κυττάρων αποτελεί βασικό στοιχείο της ομοιόστασης όλων των ιστών που σε άλλους συντελείται με γρήγορους (πχ. Γαστρεντερικό) και σε άλλους με αργούς ρυθμούς (πχ. Μυοσκελετικό, Νευρικό σύστημα) . Είναι ευνόητο ότι μια συνεχής λεπτή ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου πρέπει να υφίσταται, προκειμένου να διατηρείται η ομοιόσταση και ο σταθερός όγκος των ιστών. Στα αναπτυξιακά στάδια ενός οργανισμού και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση είναι ουσιαστικός παράγοντας της εκκαθάρισης των κυττάρων για την επακόλουθη ανανέωσή τους [193]. Ο όρος απόπτωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Kerr και συν.[194], για να περιγράψει τις μορφολογικές εκείνες μεταβολές που παρατηρούνταν ότι οδηγούν το κύτταρο στο θάνατο και ήταν εντελώς διαφορετικές από αυτές της κυτταρικής νέκρωσης.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος μπορεί να πυροδοτηθεί από εξωτερικούς παράγοντες ή από απώλεια ενός εξωτερικού ερεθίσματος (signal) που αναστέλλει την απόπτωση. Η “μεταβολή” αυτή του εξωτερικού ερεθίσματος δεν είναι από μόνη της θανατηφόρος, αλλά απαιτεί την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων όπως το c-myc, bcl-2 και p53 [195].Τουλάχιστον τρεις ερευνητικές κατευθύνσεις κατά του καρκίνου έχουν δώσει ιδιαίτερη έμφαση στην απόπτωση: η ογκογένεση, η ομοιοστασία του όγκου και ο μηχανισμός δράσης των κυτταροτοξικών φαρμάκων καθώς και της ακτινοβολίας [196].

Μορφολογία της απόπτωσης

Η απόπτωση συνήθως επηρεάζει διάσπαρτα απομονωμένα κύτταρα παρά ομάδες κυττάρων ή ολόκληρους ιστούς όπως η κυτταρική νέκρωση. Από τη στιγμή που θα ξεκινήσει, εξελίσσεται γρήγορα. Κύτταρα που μπαίνουν στη διαδικασία απόπτωσης μπορεί να εξαφανιστούν τελείως μέσα σε 4 ώρες [197] παρόλο που τα χαρακτηριστικά της διαδικασίας είναι εμφανή μόνο για περιορισμένη χρονική περίοδο. Έτσι, μεγάλοι κυτταρικοί πληθυσμοί μπορεί ήδη να έχουν καταστραφεί ενώ μόνο λίγα αποπτωτικά σώματα είναι εμφανή [198].

Το χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η συρρίκνωση του κυττάρου. Η χρωματίνη εμφανίζεται πυκνωτική και συγκεντρωμένη σε συμπαγείς μάζες δίπλα στην πυρηνική μεμβράνη. Ο πυρήνας μπορεί να εμφανίσει κατακερματισμό (καρυορρηξία) [199]. Το κύτταρο συχνά εμφανίζει πλασματικές προσεκβολές που περιέχουν πυκνωτικά πυρηνικά τμήματα. Κάποια στιγμή οι προσεκβολές αυτές διαχωρίζονται από το κύτταρο, δημιουργώντας τα λεγόμενα “αποπτωτικά σώματα” που στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται. (Σχήμα 3) Σε υπερ- μικροσκοπικό επίπεδο, οι πιο πρώιμες αλλαγές αφορούν την απώλεια των κυτταρικών συνδέσεων και εξειδικευμένες μεμβρανικές δομές όπως τα μικροοζίδια. Τα αποπτωτικά σώματα φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά μονοκύτταρα ή μακροφάγα, αλλά και από επιθηλιακά, κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου ή και καρκινικά κύτταρα. Η πέψη τους όμως δεν προάγει την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων, ούτε τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου, με αποτέλεσμα η απομάκρυνσή τους να μην προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση όπως συμβαίνει στην κυτταρική νέκρωση και ν’ αφήνει ανέπαφα τα γειτονικά κύτταρα [200].

Οι μορφολογικές και βιοχημικές διαφορές της κυτταρικής νέκρωσης και της απόπτωσης συνοψίζονται στον πίνακα 3.

Σχήμα 3. 1) Αποπτωτικά κύτταρα σε καρκίνο του παχέως εντέρου. Τα κύτταρα (βέλη) αναγνωρίζονται από τους πυκνωτικούς και καμιά φορά κατακερματισμένους πυρήνες (x 400). 2) Τα ίδια κύτταρα χρωσμένα με terminal transferase nick end labelling. Οι πυρήνες των αποπτωτικών κυττάρων χρωματίζονται έντονα (βέλη) (x 400).

Η βιοχημεία της απόπτωσης

Η ακριβής διαδικασία της απόπτωσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ακόμη, αλλά ένας αριθμός από γονίδια έχει ενοχοποιηθεί. Πιστεύεται ότι οι πρωτεΐνες που πυροδοτούν την έναρξη της διαδικασίας απόπτωσης υπάρχουν μέσα στο κύτταρο σε ανενεργή μορφή [201].

Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει μια ενδογενής DNA-άση που όταν ενεργοποιηθεί οδηγεί σε αποδόμηση του DNA και τη δημιουργία μικρομοριακών καταγμάτων με MB: 200Kd, που ηλεκτροφορητικά παίρνουν τη μορφή σκάλας [202]. Η DNA-άση αυτή φυσιολογικά εισέρχεται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ). Η δράση του bcl-2 μπορεί να οδηγεί σε είσοδο ιόντων Ca^{++} μέσω της ΕΔ μεμβράνης, απελευθερώνοντας την DNA-άση [203]. Αύξηση του Ca^{++} στο ΕΔ μπορεί επίσης να ενεργοποιεί κι άλλα ένζυμα όπως η τρανσγλουταμινάση η οποία ενέχεται για την μεταβολή των συγκολλητικών ιδιοτήτων των αποπτωτικών κυττάρων. Στην αναγνώριση και φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων, μόρια με συγκολλητικές ιδιότητες όπως οι υποδοχείς της Βιτρονεκτίνης και Θρομβοσποντίνης, συμμετέχουν ενεργά [204].

Η Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE) που ανήκει σε μια ευρύτερη κατηγορία πρωτεασών της κυστεΐνης που ονομάζονται κασπάσες (caspases: cysteine aspartic acid proteases), θεωρείται ότι παίζει επίσης ρόλο στην απόπτωση μέσω ενεργοποίησης μιας RNA πολυμεράσης. Μαζί με το Μέγα-ένζυμο B, πιθανολογείται ότι πυροδοτούν το μη αναστρέψιμο στάδιο της απόπτωσης.

Παρατηρήσεις από διάφορους ερευνητές υποστηρίζουν ότι η απόπτωση και τα πρώιμα στάδια του κυτταρικού κύκλου έχουν κοινούς μηχανισμούς ή ακόμη κι ότι αλληλοεπικαλύπτονται [205]. Γονίδια όπως το p53, c-myc, Rb-1, cyclin D1, c-fos, p34, και cdc2 που συσχετίζονται με την απόπτωση, παίζουν ρόλο και στον κυτταρικό κύκλο. Έχει αποδειχθεί όμως από διάφορους ερευνητές ότι απόπτωση μπορεί να λάβει χώρα και χωρίς την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου [206].

Πίνακας 3. Μορφολογικές και βιοχημικές διαφορές απόπτωσης και κυτταρικής νέκρωσης.

<u>Χαρακτηριστικά</u>	<u>Απόπτωση</u>	<u>Νέκρωση</u>
Ιστική κατανομή	Μεμονωμένα κύτταρα	Ομάδες κυττάρων
Ιστική αντίδραση	Φαγοκυττάρωση	Κυτταρικό εξίδρωμα
Μορφολογία	Κυτταρική συρρίκνωση	Κυτταρικό οίδημα
	Οργανίδια ανέπαφα	Οργανίδια κατεστραμμένα
	Χρωματίνη πυκνωτική, σαφώς οριοποιημένη	Χρωματίνη κατακερματισμένη
	Κυτταροπλασματικές προσεκβολές	Κυτταρόπλασμα κατακερματισμένο
	Μεμβράνη ανέπαφη	Μεμβράνη κατεστραμμένη
Βιοχημεία	Ενεργοποίηση ενδονουκλεάσης	Καταστροφή αντλίας ιόντων
	Διανουκλεοτιδική απόσχιση του DNA	Ενεργοποίηση λυσοσωματικών ενζύμων

Γονίδια εμπλεκόμενα στο μηχανισμό απόπτωσης

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση μπορεί να διακριθούν σε 4 στάδια, καθένα από τα οποία ελέγχεται από συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων που φέρουν το όνομα ced (cell death defective). Αυτά τα στάδια αφορούν “αποφάσεις” του ίδιου του κυττάρου για το αν θα θανατωθεί, τον κυτταρικό θάνατο καθαυτό, πέψη του νεκρού κυττάρου από φαγοκύτταρα και αποδόμησή του στη συνέχεια. Τα βασικά γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση είναι το bcl-2, c-myc και p53. Το bcl-2 είναι ένα πρωτοογκογονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26Kd που σχετίζεται με τις ενδοκυτταρικές μεμβράνες και έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και την περιτυρηνική μεμβράνη. Έχει αποδειχθεί πως η bcl-2 πρωτεΐνη αναστέλλει την απόπτωση και προάγει την κυτταρική επιβίωση ενώ η πρωτεΐνη bax που ανήκει στην ίδια ομάδα, προάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [207].

Η πρωτεΐνη που ελέγχεται από την έκφραση του γονιδίου p53 συμμετέχει στην απάντηση του κυττάρου κατά την καταστροφή του DNA. Όταν διαπιστωθεί βλάβη του DNA η έκφραση της πρωτεΐνης p53 έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση 1, ώστε να δοθεί χρόνος στο DNA να επιδιορθωθεί. Εναλλακτικά, η p53-πρωτεΐνη μπορεί να πυροδοτήσει την απόπτωση όταν οι μηχανισμοί αποκατάστασης του DNA αποτύχουν [208].

Όταν το γονίδιο c-myc υπερ-εκφραστεί μπορεί επίσης να οδηγήσει σε απόπτωση [209]. Η έκφρασή του σε καταστάσεις αναστολής της ανάπτυξης οδηγεί επίσης στην έναρξη της απόπτωσης. Δεν συμμετέχει επομένως στον αναπτυξιακό κυτταρικό θάνατο κατά την εμβρυογένεση όπως και το p53.

Ένα άλλο σημαντικό μόριο για τη ρύθμιση της απόπτωσης στα λεμφοκύτταρα, είναι το Fas που αποτελεί υποδοχέα της κυτταρικής επιφανείας και ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των υποδοχέων των παραγόντων νεοπλαστικής νέκρωσης (TNF). Σε απάντηση στο Fas-ligand, μια πρωτεΐνη 40Kd που παράγεται από τα T-λεμφοκύτταρα οδηγεί σε ταχεία απόπτωση των λεμφοκυττάρων που το εκφράζουν [210].

Χημειοθεραπεία και απόπτωση

Η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται για να καταπολεμήσει κυρίως προληπτικά, τις απομακρυσμένες μη-διαγνώσιμες μεταστάσεις καθώς και τις διαπιστωμένες παρόλο που εάν οι τελευταίες είναι παρών η πρόγνωση δεν είναι καλή. Έχει διαπιστωθεί όμως και είναι ευρέως αποδεκτό ότι συμβάλλει επίσης τα μέγιστα για τον έλεγχο και της τοπικής νόσου με τη συρρίκνωση του όγκου που προκαλεί.

Ο τρόπος με τον οποίο η Χ/Θ δρα είναι μέσω πυροδότησης του μηχανισμού της απόπτωσης. Ο αποσυντονισμός της κυτταρικής ομοιόστασης μέσω μεταβολής ουσιαστικών κυτταρικών λειτουργιών, αποτελούν άμεσο προϊόν της δράσης των περισσότερων χημειοθεραπευτικών παραγόντων παρόλο που οι μηχανισμοί δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Η κυτταροτοξική διαδικασία μετά την εφαρμογή Χ/Θ μπορεί να διακριθεί σε 4 στάδια: στο πρώτο στάδιο ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας διαταράσσει την κυτταρική ομοιόσταση μέσω δράσης του σε ενδοκυτταρικούς στόχους όπως το RNA, DNA ή μικροσωληνάρια. Αυτή η διαδράση οδηγεί σε δυσλειτουργία της δομής-στόχου. Το δεύτερο στάδιο αφορά την αναγνώριση από το κύτταρο, της δυσλειτουργίας αυτής που στην περίπτωση του DNA εμπλέκει το p53 και ίσως και άλλες πρωτεΐνες. Στο τρίτο στάδιο το κύτταρο εκτιμά τη βλάβη και κατά κάποιο τρόπο αποφασίζει εάν θα επιχειρήσει επιδιόρθωση ή θα αποπτωθεί. Το τέταρτο στάδιο αφορά την όλη διαδικασία της απόπτωσης. Γονίδια που προαναφέρθηκαν συμμετέχουν κι εδώ. Έτσι η μπλεομυκίνη και η δοξορουβικίνη φαίνεται να προωθούν την έκφραση των Fas και FasL σε συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο [211]. Ακόμη η p53 πρωτεΐνη φαίνεται να προωθεί επίσης την έκφραση του Fas. Μεταλλάξεις στην p53 διαταράσσουν την αναγνώριση από το κύτταρο της βλάβης του DNA και συνεπώς και την έναρξη της απόπτωσης [212].

Υπερ-έκφραση του bcl-2 έχει συσχετιστεί με αντίσταση στη χημειοθεραπεία σε χρόνια λεμφογενή λευχαιμία [213].

Ακτινοθεραπεία και απόπτωση

Η παραδοσιακή αντίληψη για τη δράση της Α/Θ ήταν ότι προκαλεί καταστροφή του DNA πέρα από ένα όριο το οποίο δεν μπορεί να αντιστραφεί. Σήμερα όμως γνωρίζουμε ότι προκαλεί μια σειρά από ενδοκυτταρικές βλάβες όπως μεταβολές στην κυτταρική μεμβράνη, ενεργοποίηση της διαδικασίας οξειδωτικού στρες και πυροδότηση της έκφρασης γονιδίων. Πολυάριθμες μελέτες απέδειξαν in-Vitro ότι η Α/Θ οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης [214] και μάλιστα με την ίδια σημαντικότητα όσο και η χημειοθεραπεία. Κυτταρικές σειρές που υπερ-εκφράζουν το bcl-2 γονίδιο φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα στην Α/Θ και ακόμη κύτταρα που στερούνται του άγριου τύπου του p53 παρουσιάζονται πιο ανθεκτικά στην απόπτωση που οφείλει την έναρξή της στην ακτινοθεραπεία [215,216].

Αυτές οι παρατηρήσεις μπορεί να έχουν δύο εφαρμογές : α) η ευαισθησία στην ακτινοθεραπεία μπορεί να προβλεφθεί με βιοψία προ της έναρξής της και υπολογισμό του αποπτωτικού δείκτη και της παρουσίας ή μη των γονιδίων που ευνοούν την απόπτωση, με απώτερο σκοπό την αναγνώριση των όγκων που θα είναι ανθεκτικοί και

των ασθενών με φτωχή απάντηση, γεγονός που θα οδηγούσε σε αποφυγή έναρξης μιας θεραπείας που δεν θα είχε καλά αποτελέσματα αλλά σημαντική νοσηρότητα και β) αφού ακτινοανθεκτικοί όγκοι θ'αναγνωρίζονταν με τις μεθόδους αυτές, επιδιόρθωση της αποπτωτικής οδού με την ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων μετά από χορήγηση των κατάλληλων γονιδίων-πρωτεϊνών (πχ. Εισαγωγή του άγριου τύπου του p53) , θα οδηγούσε σε καλύτερη πρόγνωση τελικά [217].

Ο τρόπος με τον οποίο δρουν οι προαναφερθείσες μέθοδοι θεραπείας στο μηχανισμό απόπτωσης συνοψίζεται στο σχήμα 4 [218].

Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Με δεδομένη τη σημαντικότητα της απόπτωσης ως γενικού μηχανισμού εκκαθάρισης φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων, είναι εύλογο ότι η έρευνα θα στρέφονταν και προς την κατεύθυνση αυτή. Εκφυλιστικές νόσοι χαρακτηριζόμενες από την απόπτωση φυσιολογικών κυττάρων θα μπορούσαν να βρουν θεραπεία εάν διάφορες τεχνικές μπορούσαν να αυξήσουν την αντίσταση των κυττάρων στην απόπτωση.

Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών αποτελούν ήδη η χρήση αυξητικών παραγόντων για την ενεργοποίηση της ανάνηψης των κυττάρων του αιμοποιητικού μετά τη χημειοθεραπεία, η χρήση νευροτροφικών παραγόντων για την υποστήριξη των νευρώνων σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις [219] και η χρήση αντιοξειδωτικών παραγόντων για να αποφευχθεί η απόπτωση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων στη νόσο του AIDS [220]. Προσπάθειες για αναστολή του προαγόμενου από το TNF (Tumor Necrosis Factor) κυτταρικού θανάτου με θεραπεία με διαλυτό fas-receptor ή αντι-TNF αντισώματα, έχουν ήδη γίνει [221]. Προς την άλλη κατεύθυνση, απομάκρυνση των παθολογικών (καρκινικών ή ανοσοανταγωνιστικών) κυττάρων, μπορεί να επιτευχθεί μέσω ενεργοποίησης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η αντι-οιστρογονική θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού και η αφαίρεση των ανδρογόνων για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.

Η λογική αυτή προσέγγισης της θεραπείας φαίνεται ελκυστική και ακούγεται εύκολη, αλλά κάθε άλλο παρά απλή είναι. Οι παράγοντες αυτοί που μετέχουν στους μηχανισμούς της απόπτωσης έχουν πλειοτροπική δράση και εκλεκτική αναστολή ή ενεργοποίησή τους για το συγκεκριμένο σκοπό δεν είναι δυνατή. Η απόπτωση επίσης είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός και η παρέμβασή μας σε ένα ή και περισσότερα επίπεδα δεν μπορεί να εγγυηθεί το αποτέλεσμα. Τέλος πολλοί από τους παράγοντες αυτούς όπως το bcl-2, ανήκουν σε μια ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών με πολύπλοκες δράσεις και αντιδράσεις που καθιστά δύσκολή την παρέμβαση με προβλεπόμενο αποτέλεσμα. Δεν υπάρχει όμως αμφιβολία ότι η αποτελεσματική και εκλεκτική παρέμβασή μας στον μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, υπόσχεται πολλά για το μέλλον.

Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση των κυτταρικών γεγονότων που συμμετέχουν στην οδό απόπτωσης, από τον πυροδοτούντα μηχανισμό (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ορμονικό αποκλεισμό κτλ) στην ενδιάμεση οδό της απόφασης για επιδιόρθωση ή στην τελική οδό της απόπτωσης.

Οι Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ 70 (Heat Shock Proteins 70)

Γενικά

Όλοι οι ζώντες οργανισμοί απαντούν, σε κυτταρικό επίπεδο, σε δυσμενή ερεθίσματα όπως το θερμικό σοκ ή άλλες καταστάσεις στρες, με την γρήγορη, έντονη και παροδική επιτάχυνση στην έκφραση ενός μικρού αριθμού ειδικών γονιδίων των γονιδίων θερμικού σοκ (Heat Shock Genes). Το αποτέλεσμα αυτής της έκφρασης είναι οι παραγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, οι οποίες είναι παρών και υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά σε μικρότερες ποσότητες. Η ενεργοποίηση της υπερέκφρασης των γονιδίων θερμικού σοκ υπό καταστάσεις στρες συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα όλων των οργανισμών με ελάχιστες εξαιρέσεις όπως κατά την πρώιμη εμβρυονική ανάπτυξη [222]. Πέρα από το θερμικό σοκ, κι άλλες καταστάσεις μπορεί να προκαλέσουν παρόμοια αντίδραση του οργανισμού, όπως η ανοξία, η προσθήκη 2,4-δινιτροφαινόλης (αποσυντονιστής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) ή η προσθήκη αζιδικού νατρίου (δηλητήριο της κυτταρικής αναπνοής). Άλλοι προαγωγοί παράγοντες της κυτταρικής "απάντησης στρες" είναι το αρσενικό νάτριο, η αιθανόλη, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανάλογα αμινοξέων και ακόμη ιογενείς λοιμώξεις [223].

Οι σημαντικότερες πρωτεΐνες θερμικού σοκ έχουν ταξινομηθεί σε 4 μεγάλες οικογένειες: α) τις μεγάλου μοριακού βάρους 83-90 Kd, HSP β) τις HSP70, με μοριακό βάρος από 66-78 Kd, γ) τις HSP60 που απαντούν στα βακτηρίδια, τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες και δ) τις μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 15-30 Kd που απαντούν στον άνθρωπο με μία και μοναδική μορφή και στα ανώτερα φυτά με πάνω από 30 μορφές. Ειπώθηκε πριν ότι οι πρωτεΐνες αυτές απαντούν στα κύτταρα και υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις, δηλώνοντας τη σημαντικότητά τους για βασικές λειτουργίες του κυττάρου. Σειρά από μελέτες υποστηρίζουν ότι η βασική λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών είναι να προστατέψουν το κύτταρο από τις βλαβερές συνέπειες του κάθε μορφής στρες και να το βοηθήσουν να επιβιώσει [224].

Όσον αφορά την οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 (HSP70) έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα 4 στελέχη: α) η 73 Kd που βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα σε κυτταρικές θερμοκρασίες 37° αλλά απαντά και στον πυρήνα και πυρηνίσκο μετά από θερμικό σοκ, β) η 72 Kd που είναι ομόλογη της προηγούμενης και απαντά επίσης στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και πυρηνίσκο και αυξάνεται κατά πολύ σε συνθήκες κυτταρικού στρες, γ) η 75 Kd που είναι ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη και απαντά κυρίως στα μιτοχόνδρια και δ) η 80 kD που είναι επίσης γλυκόζη-ρυθμιζόμενη και απαντά στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Χαρακτηριστικά και λειτουργία των HSP70

Η οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 αποτελεί την πιο ευρέως απαντούμενη ομάδα πρωτεϊνών στρες που συμμετέχουν στον κύκλο κυτταρικής λειτουργίας από τους πιο πρωτόγονους στους πιο εξειδικευμένους οργανισμούς. Η οικογένεια περιλαμβάνει στελέχη που εκφράζονται υπό κανονικές συνθήκες ή επηρεαζόμενα από άλλους παράγοντες και τα οποία σχετίζονται με διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα όπως το κυτταρόπλασμα (Hsp70/Hsc70), τα μιτοχόνδρια (Hsp75) και το ενδοπλασματικό δίκτυο (grp78). Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 εξασφαλίζουν τη συντονισμένη ρύθμιση της πρωτεϊνικής διαμεταφοράς, την μεταφορά και πτύχωση τους [225] και ελαχιστοποιούν

την κυτταρική καταστροφή μετά από στρες με την ιδιότητά τους να εμποδίζουν την πρωτεϊνική συνάθροιση στην κυτταρική μεμβράνη και να επιδιορθώνουν τη λειτουργία των μετουσιωμένων πρωτεϊνών [226].

Ο βιολογικός ρόλος των HSP70 διέπεται από μια βασική αρχή: την ιδιότητά τους να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες ή με πολυπεπτιδικά υποστρώματα [225]. Η ιδιότητα να συνδέουν πεπτίδια επιτελείται μέσω της αλληλεπίδρασης του καρβονικού τελικού άκρου τους με τα υδρόφοβα εκτεθειμένα κατάλοιπα των ξεδιπλωμένων πολυπεπτιδικών υποστρωμάτων [227]. Ακόμη φαίνεται ότι μπορεί να αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό γηγενών, πτυχωμένων πρωτεϊνικών "συντρόφων" όπως η p53, η Bag-1, ο HSF-1 (Heat-Shock factor-1) και άλλες Hsp [228]. Η σχέση των HSP70 με τα πεπτίδια-στόχους τους ρυθμίζεται επιπλέον μέσω της δράσης του αζωτούχου τελικού, συνδέοντος την ATP-άση άκρου τους, το οποίο συνδέει και υδρολύει την ATP-άση, μεσολαβώντας έτσι σε μια σειρά από γρήγορους κύκλους σύνδεσης-αποσύνδεσης μεταξύ της HSP70 και του πεπτιδικού της υποστρώματος [229]. Το ATP συνδεόμενο τμήμα της πρωτεΐνης, συνδέει και απελευθερώνει τα πεπτίδια με γρήγορο ρυθμό με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη συγγένειά τους, ενώ το ADP συνδεόμενο τμήμα, ενώνεται με τα πεπτίδια πιο αργά αλλά πιο σταθερά [230]. Η οχηματαγωγική δράση των HSP70 επηρεάζεται επιπλέον και από άλλους παράγοντες που καταλύουν την υδρόλυση του ATP σε ADP από την πρωτεΐνη [231].

Η πρώτη κυτταροπροστατευτική ιδιότητα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ που παρατηρήθηκε, ήταν ότι η έκθεση των κυττάρων σε ένα αρχικό χαμηλό υπερθερμικό σοκ, τα καθιστούσε ανθεκτικά σε ένα επακόλουθο, πολύ πιο σοβαρό και φυσιολογικά θανατηφόρο σοκ [232]. Αυτή η κατάσταση θερμοανθεκτικότητας βρέθηκε να σχετίζεται άμεσα με την επαγωγή της έκφρασης των HSP και κυρίως των HSP70 μετά το πρώτο ερέθισμα [233]. Τα θερμοανθεκτικά κύτταρα έδειχναν να αντιστέκονται στην απόπτωση και αυτό συσχετίστηκε άμεσα με την έκφραση των HSP70 [234]. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι η επαγωγή θερμοανθεκτικής κατάστασης και προστασία κατά του προκαλούμενου από στρες κυτταρικού θανάτου, παρατηρείται επίσης σε προκαρυωτικούς οργανισμούς που δεν εμφανίζουν το φαινόμενο της απόπτωσης. Αυτό φανερώνει μια θεμελιώδη ενισχυτική δράση των HSP προς την κυτταρική επιβίωση, η οποία μπορεί να είναι και εντελώς ανεξάρτητη από την διαδικασία της απόπτωσης. Μεγάλος αριθμός μελετών όμως απέδειξε ότι η προστατευτική δράση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 κατά του κυτταρικού θανάτου, οφείλεται τουλάχιστον σε μεγάλο βαθμό αν και όχι αποκλειστικά στην ιδιότητά τους να καταστέλλουν το μηχανισμό της απόπτωσης [235,236,237]. Πιο συγκεκριμένα ακόμη, οι HSP70 προστατεύουν εναντίον πολλαπλών αποπτωτικών ερεθισμάτων όπως είναι η καταστροφή του DNA, η Υπεριώδης ακτινοβολία και μια ποικιλία από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [238]. Ο ακριβής μηχανισμός όμως δράσης τους κατά του αποπτωτικού μονοπατιού, παραμένει ασαφής στο σύνολό του.

Ο ρόλος των HSP70 στη διαδικασία της απόπτωσης

Έχει αναφερθεί ήδη ότι η απόπτωση χαρακτηρίζεται από ορισμένους τυπικούς μορφολογικούς χαρακτήρες όπως η ασαφοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης, η πύκνωση της χρωματίνης και ο κατακερματισμός του πυρήνα. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που προωθούν αυτές τις ιδιαίτερες αλλαγές, περιλαμβάνουν τον κατακερματισμό του DNA μέσω της δράσης μιας ενδονουκλεάσης και την έκθεση φωσφατιδิล-σερινικών καταλοίπων. Μερικές ή και όλες οι διαδικασίες αυτές μπορεί να παρατηρηθούν κατά την απόπτωση και αποτελούν αυτό που ονομάστηκε "εκτελεστική φάση" της.

Η εκτέλεση της απόπτωσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο μιας ομάδας πρωτεασών της κυστεΐνης που ως γνωστό ονομάζονται κασπάσες και έχουν ειδικότητα για τα ασπαρτικά κατάλοιπα [239]. Οι κασπάσες συνθέτονται σε ανενεργή μορφή και πρέπει να περάσουν μια διαδικασία φαινομένων "χιονοστιβάδας" προκειμένου να μετατραπούν στην ενεργή πρωτεΐνη. Αδρά διαχωρίζονται σε εναρκτήριες και εκτελεστικές. Οι εναρκτήριες, όπως η κασπάση-9, έχουν στο αζωτούχο τελικό άκρο τους ειδικά τμήματα για την προώθηση της διαδράσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης: τμήματα επιστράτευσης κασπασών (Caspase Recruitment Domains-CARDs) και τμήματα επηρεάζοντα τον κυτταρικό θάνατο (Death Effect Domains-DEDs). Η σύνδεση του αντίστοιχου μορίου προκαλεί ενεργοποίηση των κασπασών προς το ώριμο μόριό τους. Οι εκτελεστικές κασπάσες, οι οποίες περιλαμβάνουν την κασπάση -3, προωθούνται από τις εναρκτήριες προκειμένου να δράσουν πρωτολυτικά. Αυτές οι τελευταίες διασπούν πρωτεϊνικά υποστρώματα "κλειδιά", που αποτελούν την απαρχή της διαδικασίας της απόπτωσης. Ο σχηματισμός αποπτοσωμάτων, η δράση του παράγοντα ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης 1 (Araf-1), η υδρόλυση του ATP σε ADP και ο ρόλος του κυτοχρώματος c έχουν αναφερθεί ήδη. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση των κασπασών και για τη δημιουργία του αποπτοσώματος. Ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης του κυτοχρώματος παραμένει ασαφής όπως και πολλές άλλες μιτοχονδριακές μεταβολές όπως η απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης τους ($\Delta\psi$ m), η ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης τους, αλλαγές στη διαπερατότητα και εξοίδηση [240]. Σε κάθε περίπτωση, μέλη της οικογενείας των Bcl-2, των προ- ή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, φαίνεται να ασκούν τη δράση τους προς την κατεύθυνση της κυτταρικής επιβίωσης μέσω της καταστολής ή προώθησης της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [241].

Η ανασταλτική προς την κυτταρική απόπτωση δράση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70, όπως έχει αποδειχθεί από πρόσφατες μελέτες, φαίνεται να έχει τη βάση της στην καταστολή των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα μέσα στα μιτοχόνδρια και στην αναστολή απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [242,243,244]. Οι μελέτες αυτές αφορούσαν κυρίως το δυναμικό σχηματισμού αποπτοσωμάτων, όταν σε διάλυμα κυττάρων in-Vitro προστίθονταν εξωγενές κυτόχρωμα c και d ATP και παρακολουθούνταν η ενεργοποίηση ή μη του συστήματος των κασπασών [245]. Οι HSP70 φάνηκε να αναστέλλουν ενεργά την αντίδραση χιονοστιβάδας των κασπασών και τη διάσχιση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, υπό αυτές τις συνθήκες, γεγονός που αποδείκνυε ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι ικανές, αν και όχι απαραίτητως οι μόνες, να ανατρέψουν την έκλυση του κυτοχρώματος c απ'τα μιτοχόνδρια, αναχαιτίζοντας σε τελική ανάλυση το μηχανισμό της απόπτωσης [246]. Η αναστολή της αντίδρασης των κασπασών απαιτεί ένα λειτουργικό καρβονικό άκρο, από τη μεριά των HSP70, που είναι ικανό να συνδέει πεπτίδια [242,243,244] ενώ η ανάπτυξη θερμοανθεκτικότητας και η αντίσταση των κυττάρων προς την απόπτωση, προϋποθέτει την ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα στόχους τους [247]. Ο πιο ευρέως αποδεκτός μηχανισμός με τον οποίο οι HSP70 αναστέλλουν τη δράση του συστήματος των κασπασών, είναι με την άμεση επίδρασή τους επί του Araf-1 και την αποτροπή της επιστράτευσης της προκασπάσης-9 στο αποπτωτικό σύμπλεγμα [242,243]. Οι ακριβείς όμως λεπτομέρειες της δράσης αυτής δεν έχουν διασαφηνιστεί. Ο Saleh και συν. ανέφεραν ότι η διααντίδραση των HSP70 με το CARD τμήμα του Araf-1 είχε σαν αποτέλεσμα την αποτροπή ολιγομερισμού του τελευταίου και συνεπώς της επιστράτευσης της προκασπάσης- 9 [243]. Ο Beere και συν. αντιθέτως ανέφεραν ότι η σχετιζόμενη με το σύστημα cytochrome c / d ADP λειτουργία του Araf-1 παρατηρήθηκε παρά την παρουσία των HSP70, αλλά οι προκασπάσες -3 και -9

απέτυχαν να συνδεθούν με το σύμπλεγμα αυτό (με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν που προαναφέρθηκε) [242]. Βέβαια οι δυο αυτές μελέτες στην ουσία καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα και η αντίφασή τους μπορεί να αφορά απλά και μόνο διαφορετική παρατήρηση και επεξήγηση των αποτελεσμάτων. Έχει ακόμη υποστηριχθεί ότι ο Araf-1 μπορεί να απαντά σε διάφορα ισομερή και ότι το σύμπλεγμα και ο μηχανισμός απόπτωσης ρυθμίζονται εκλεκτικά από διάφορες πρωτεΐνες που είναι ακόμη άγνωστες [248]. Συνηγορικά σ' αυτή την υπόθεση λειτουργεί η παρατήρηση ότι και η HSP90 μπορεί υπό κατάλληλες συνθήκες να επηρεάσει τον ολιγομερισμό του Araf-1 αναχαιτίζοντας έτσι τη διαδικασία απόπτωσης, με μηχανισμό που δεν είναι ευκρινής στο σύνολό του [249].

Ίσως θα ήταν θεμιτό μετά από όλες αυτές τις παρατηρήσεις να υποθέσουμε ότι εκτός του συμβατικού μηχανισμού απόπτωσης (ότι δηλαδή η διαντίδραση του Araf-1, cytochrome c, d ATP και procaspase -9 είναι συνθήκη απαραίτητη και ικανή για την ενεργοποίηση των κασπασών), υπάρχει και ένας πρόσθετος, πιο ασαφής ρυθμιστικός μηχανισμός απόπτωσης. Η προσθήκη του μηχανισμού αυτού στο παραπάνω σύμπλεγμα μπορεί να απαιτεί ανάλογες μεταβολές στο μόριο του Araf-1, μερικές από τις οποίες επηρεάζονται και ελέγχονται από το κυτόχρωμα c, το d ATP και την προκασπάση -9. Είναι πολύ πιθανό η σύνδεση των παραγόντων αυτών στο μόριο του Araf-1 να ελέγχεται ανεξάρτητα από τις HSP70 και μόνο. Ο ρόλος άλλωστε του παράγοντα τροποποίησης της λειτουργίας και αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, ταιριάζει απόλυτα στις HSP70 [250].

Οι πιο σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 επεμβαίνουν αναχαιτίζοντας τη διαδικασία απόπτωσης από το μιτοχονδριακό στάδιο κι έπειτα, ενώ δε φαίνεται να επηρεάζουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c [244,246], αν και υπήρξε μια έρευνα που απέδειξε πως η επιβίωση του κυττάρου μετά από θερμικό σοκ ήταν αποτέλεσμα της αναστολής απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια [247]. Οι HSP70 επίσης αποτρέπουν την απελευθέρωση του εν λόγω κυτοχρώματος από τα κύτταρα μετά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου [235], υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τους στη ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών της οικογενείας Bcl-2. Για παράδειγμα, η ιδιότητα των HSP70 να καταστέλλουν την ενεργοποίηση της c-Jun N- terminal Kinase (JNK), θα μπορούσε να αναστείλει με τη σειρά της τα ελεγχόμενα από κινάσες προ-αποπτωτικά σήματα [251], δυνητικά προκαλώντας τη φωσφορυλίωση και ανενεργοποίηση της Bcl-2 [252], με αποτέλεσμα την έμμεση αναχαίτιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c.

Συμπερασματικά, πολλά από τα μέχρι τώρα δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι HSP70 λειτουργούν αναχαιτίζοντας την απόπτωση, παρεμβαίνοντας στη διαδικασία της από το σημείο της συμμετοχής των μιτοχονδρίων ως τον κυτταρικό θάνατο και ειδικά (αλλά όχι αποκλειστικά) στο επίπεδο του αποπτωτικού συμπλέγματος [242,243,244]. Αυτό υποστηρίζεται επίσης από το γεγονός ότι η σχετιζόμενη με τη δράση του Fas απόπτωση, η οποία μπορεί να ακολουθήσει οδό ανεξάρτητη των μιτοχονδρίων, δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την υπέρ-έκφραση των HSP70 [252,253]. Φυσικά, η αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί στο στρες, είναι μια αποτελεσματική στρατηγική διατήρησης της κυτταρικής επιβίωσης (πχ Bcl-2) και είναι εμφανές ότι κάποιες από τις HSP παρεμβαίνουν και στο επίπεδο αυτό.

Η σύνοψη των προτεινόμενων μηχανισμών δράσης των HSP70 κατά της κυτταρικής απόπτωσης απεικονίζεται στο σχήμα 5.

Σχήμα 5. Περίληψη των προτεινόμενων μηχανισμών δράσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 (HSP70) στην αναχαίτιση της κυτταρικής απόπτωσης. Αποπτωτικά ερεθίσματα, περιλαμβάνοντας το JNK και την ενεργοποίηση των μελών της οικογενείας Bcl-2, συγκεντρώνονται στα μιτοχόνδρια προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο συνδέεται με τον παράγοντα ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης-1 (Apaf-1) και με την παρουσία του γ d ATP/ATP, προάγει τον ολιγομερισμό του Apaf-1. Το σύμπλεγμα του Apaf-1, απομονώνει την προκασπάση-9, η οποία τότε αυτοενεργοποιείται, επιστράτευει και διασχίζει την προκασπάση-3. Η τελευταία είναι ικανή να διασπάσει καταλυτικά τα υποστρώματα στόχους της, πυροδοτώντας την διαδικασία της απόπτωσης. Οι HSP φαίνεται να παρεμβαίνουν σε πολλαπλά σημεία σ' αυτό το μονοπάτι, τα οποία περιλαμβάνουν αναστολή της ενεργοποίησης του JNK, παρεμπόδιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και διακοπή του σχηματισμού αποπτοσώματος με την σύνδεση στο εν λόγω κυτόχρωμα, αναστολή του ολιγομερισμού του Apaf-1 και καταστολή της επιστράτευσης της προκασπάσης. Ακόμη και αναστολή του κυτταρικού θανάτου μετά την ενεργοποίηση των κασπασών όπως και μετά τη διάσχιση των υποστρωμάτων, έχει αναφερθεί.

Το γεγονός ότι μετά την έκθεση στο στρες, το κύτταρο υπόκειται σε μια διαδικασία κρίσης για το αν θα επιδιορθωθούν οι μηχανισμοί λειτουργίας του και θα επιβιώσει ή θα αποπταθεί, κάνει σαφές ότι θα πρέπει να υπάρχει μια λειτουργική αλληλεξάρτηση των δύο αυτών διαφορετικών απαντήσεων. Βέβαια, η σχέση τους δε φαίνεται να είναι τόσο απλή όπως απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα. Η ποικιλία και το πλήθος των δράσεων των μελών της οικογενείας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, δημιουργεί το δυναμικό για πολλαπλά σημεία παρέμβασής τους κατά μήκος του μονοπατιού της απόπτωσης και τη ρύθμιση της κυτταρικής απάντησης στο στρες. Αυτή η απλή/σύνθετη δράση των HSPs και κυρίως των HSP70 βρίσκεται σήμερα υπό εκτεταμένη έρευνα.

Εισαγωγή -- Τα ογκογονίδια

Ίσως η πιο συναρπαστική ανακάλυψη του πρόσφατου παρελθόντος. Το πρώτο ογκογονίδιο που αναγνωρίστηκε ήταν το v-src, προερχόμενο από τον RSV (έναν ιογενή ρετροϊό), που μπορούσε να μεταμορφώσει καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων κοτόπουλου, σε νεοπλασία [254]. Αργότερα διαπιστώθηκε πως το φυσιολογικό DNA περιείχε τη σειρά βάσεων που κωδικοποιούσε το ομόλογο γονίδιο, το c-src (cellular – src). Αυτό σήμαινε ότι ο εν λόγω ρετροϊός με κάποιο τρόπο δανείστηκε στο παρελθόν το γονίδιο src, το οποίο στη συνέχεια μεταλλάχτηκε και απέκτησε την ιδιότητα να μεταμορφώνει τα κύτταρα.

Τα ογκογονίδια λοιπόν είναι φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια) που η έκφρασή τους είναι απαραίτητη για τη λειτουργία και την ανάπτυξη του κυττάρου, αλλά όταν για κάποιους λόγους μεταλλαχθούν, τότε μέσω διαφόρων μηχανισμών απορυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και οδηγούν σε νεοπλασία. Αυτό βέβαια δεν είναι τόσο απλό όσο ακούγεται, αφού υπάρχει πλήθος παραγόντων που συμβάλλουν στην εκδήλωση της διαταραχής αυτής, αλλά το σημαντικό είναι ότι τα ογκογονίδια αποτελούν μεταλλαγμένα φυσιολογικά γονίδια.

Μια από τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου είναι ως γνωστό η ικανότητα να αναπαράγει τον εαυτό του, η μίτωση. Κατά τη διαδικασία αυτή το DNA ξεδιπλώνεται και αντιγράφεται. Οι μεταλλάξεις είναι σπάνιο φαινόμενο και μπορεί να προέλθουν από μεγάλα “λάθη” κατά την αντιγραφή του ,όπως η εξάλειψη τμημάτων του χρωμοσώματος ή από χρωμοσωμικές δια-ανταλλαγές ή από μικρότερα όπως η αλλαγή σε ένα ή δύο ζευγάρια βάσεων στην έλικα του DNA. Το κύτταρο που θα δημιουργηθεί ανταποκρίνεται στις λειτουργίες του μέσω παραγωγής πρωτεϊνών, που προέρχονται από την αποκωδικοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων που αποτελούν σειρές βάσεων του DNA. Όταν ένα γονίδιο λοιπόν μεταλλαχθεί, μπορεί να παράγει μια πρωτεΐνη ή οποία είναι ικανή να προάγει την καρκινογένεση και τότε ονομάζεται ογκογονίδιο.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες ογκογονιδίων : τα κυρίαρχα ογκογονίδια (dominant oncogenes) και τα “καταπνέζοντα τον όγκο” γονίδια (tumor suppressor genes) [255]. Τα πρώτα κωδικοποιούν πρωτεΐνες (παράγοντες κυτταρικής ανάπτυξης, υποδοχείς παραγόντων πολλαπλασιασμού κτλ.) που μπορεί να προκαλέσουν από μόνες τους τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ενώ τα δεύτερα δίνουν γένεση σε πρωτεΐνες των οποίων ο ρόλος είναι να καταστείλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [255,256,257]. Στα δεύτερα ανήκουν το Γονίδιο Ρετινοβλαστώματος (RB1) που ήταν το πρώτο που αναγνωρίστηκε και το p53.

Το ογκογονίδιο p53

Το πιο εκτεταμένα ερευνημένο “tumor suppressor” ογκογονίδιο, που πήρε το όνομά του από το μοριακό βάρος της αντίστοιχης πρωτεΐνης που κωδικοποιεί (53 k Da) και βρίσκεται αλλοιωμένο στην πλειονότητα των κακοήθων όγκων [258]. Ανευρίσκεται στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος 17 (17p), αποτελείται από 11 εξόνια και 5 ιδιαίτερα συντηρητικές περιοχές [258,259]. Το παράγωγό του όπως ειπώθηκε είναι μια πυρηνική φωσφο-πρωτεΐνη, η οποία έχει την ιδιότητα να συνδέεται με συγκεκριμένη σειρά βάσεων [RRRC (A/T) (T/A) GYYY, όπου R είναι μια πουρίνη και Y μια πυριμιδίνη] του DNA [260,261] και να λειτουργεί ως ενεργοποιητής της αντιγραφής των γονιδίων στόχων της. Τέτοια γονίδια είναι το mdm-2, p21^{waf1,cip1}, GADD45, Bax, Bcl-2, Cyclin

G, Fas, Thrombospondin, Anti-angiogenic factor, HIC-1 και IGF-binding protein 3 [262]. Η έκφραση των γονιδίων αυτών είναι καθοριστική για την αποτροπή της ογκογένεσης [263], αφού τα προϊόντα τους είναι άμεσα σχετιζόμενα με τη διακοπή της ανάπτυξης και με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Οι παρατηρήσεις αυτές έδωσαν στην p53 τον τίτλο του φύλακα του γονότυπου (“guardian of the genome”) αφού φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο της βλάβης που έχει υποστεί το DNA από διάφορους παράγοντες και την απόφαση για το αν θα δοθεί στο κύτταρο η ευκαιρία να επιδιορθώσει αυτό ή να ακολουθήσει την οδό της απόπτωσης [264]. Κατά την απουσία φυσιολογικά λειτουργούσας p53, δεν υπάρχει η κριτική απάντηση στην καταστροφή του DNA με την πιθανότητα να εξελιχθεί νεοπλασία. Η πρωτεΐνη μπορεί να καταστεί ανενεργή από μια σειρά μεταλλάξεων στο γονίδιο, όπως η απλή αλλαγή μιας βάσης (point mutation), η οποία αυξάνει το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης, απώλεια αλληλίων, αναταξινομήσεις βάσεων και διαγραφές τμημάτων του γονιδίου, όλες από τις οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε ογκογένεση λόγω της απώλειας του ελέγχου πολλαπλασιασμού [258,259]. Περίπου το 50% των όγκων στον άνθρωπο, παρουσιάζουν ελαττωματική λειτουργία της p53 [259,265].

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων στην p53 αφορά απλή αλλαγή ζεύγους βάσεων (point mutations) ή αμινοξέων που μπορεί να όμως να οδηγήσουν σε πλήρη διαφοροποίηση της πρωτεΐνης. Η φυσιολογική ή “άγρια” μορφή της αποτελεί μια τετραμερή πρωτεΐνη που δρα ως παράγοντας αντιγραφής μέσω σύνδεσης στο DNA των κυττάρων-στόχων της ενώ η μεταλλαγμένη μορφή έχει χάσει αυτή την ιδιότητα. Οι μέθοδοι με τις οποίες ερευνούνται αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν την κυτταρογενετική (χρωμοσωμικές αναταξινομήσεις, απώλεια της ετερογένειας) [259,266], και απεικόνιση του DNA με τεχνικές γέλης [single strand conformation polymorfism (SSCP), constant denaturent gel electrophoresis (CDGE)], [267]. Μεταλλάξεις συγκεκριμένων βάσεων μπορεί να ανιχνευθούν με αντίδραση αλυσίδας της πολυμεράσης (PCR) και με διαχωρισμό του DNA [259]. Έχει αποδειχθεί ότι οι “σημειακές μεταλλάξεις” εμφανίζονται στην συντριπτική πλειοψηφία τους σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου και μάλιστα μπορεί η εντόπισή τους να έχει και προγνωστική σημασία.

Ακόμη μπορεί ένα φυσιολογικό γονίδιο να παράγει τον “άγριο τύπο” της πρωτεΐνης η οποία όμως στη συνέχεια απενεργοποιείται μέσω της σύνδεσής της με ιογενείς ή άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως η mdm-2, και να αθροίζεται στο κυτταρόπλασμα ή και να αποδομείται, απωλένοντας τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτή η διαταραχή είναι συχνή στα σαρκώματα [262]. Το mdm-2 (murine double minute-2) για παράδειγμα απενεργοποιεί την p53 συνδεόμενο με αυτήν και αναστέλλοντας την δράση της ως παράγοντα προαγωγής της αντιγραφής των γονιδίων-στόχων της [268]. Το γονίδιο αυτό αυξάνεται σε πολλά μεταστατικά οστεοσαρκώματα, πιθανότατα ως καθυστερημένο γεγονός [269], και έχει ανιχνευθεί σε 8 από 24 σαρκώματα σε μια μελέτη [270]. Ο Cordon-Cardo και συν. [271], μελέτησε 211 σαρκώματα μαλακών μορίων ανοσοϊστοχημικά, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα για το mdm-2 και την p53 και κατέγραψε τη σχέση μεταξύ της υπερ- έκφρασής τους και της πρόγνωσης. Ασθενείς με μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια είχαν τη χειρότερη πρόγνωση, αυτοί με μετάλλαξη στο ένα μόνο (ανεξάρτητα πιο) είχαν ενδιάμεση πρόγνωση και αυτοί χωρίς μεταλλάξεις έδειξαν την καλύτερη πρόγνωση για μακρά επιβίωση. Ένα άλλο γονίδιο που φαίνεται να σχετίζεται με τη λειτουργία της p53, είναι το SAS (Sarcoma-Associated Antigen) που βρίσκεται επίσης αυξημένο στα σαρκώματα [272].

Η δράση της πρωτεΐνης p53

Η έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA όπως η ακτινοβολία και οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες οδηγεί στην ενεργοποίηση και τη σταθεροποίηση του "άγριου/φυσιολογικού" τύπου της p53 [273]. Ακόμη και η υποξία (μια φυσιολογική σχετική κατάσταση αναπτυσσόμενη στους όγκους που απαιτούν έντονη αγγείωση για την ανάπτυξή τους) φαίνεται να συγκεντρώνει τη φυσιολογική p53 στα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη διακοπή της αύξησης στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου ή την απόπτωσή τους [274]. Όταν όμως η πρωτεΐνη χάσει τη φυσιολογική λειτουργία της λόγω μεταλλάξεων ή απωλειών των χρωμοσωμάτων, τότε τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν αποπύπτουν μετά από καταστροφή του DNA με συνέπεια δύο καταστρεπτικά αποτελέσματα : αντίσταση στην αντινεοπλασματική θεραπεία και άθροιση περαιτέρω μεταλλάξεων [275]. Παρόλα αυτά υπήρξαν και μελέτες που υποστήριξαν ότι η απόπτωση δεν επηρεάζεται πάντα από τη λειτουργική κατάσταση της p53 και επομένως ο ρόλος της στη θεραπευτική απάντηση των όγκων αυτών στην αντινεοπλασματική θεραπεία είναι διφορούμενος [276]. Μάλιστα σε ισχυρές δόσεις in-Vitro όλοι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες πυροδοτούν τη διαδικασία της απόπτωσης ακόμη και σε απουσία της p53 [277].

Η δράση της p53 αφορά πρωταρχικά αναστολή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (G1 checkpoint) που επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του waf 1 αναστολέα της κινάσης της κυκλίνης (waf : wild-type p53-activated fragment) [278]. Η απώλεια όμως του "G1 checkpoint" δεν είναι πάντα ικανή να καθορίσει τις θανατηφόρες συνέπειες της ακτινοθεραπείας γεγονός που συνηγορεί στην αρχική υπόθεση ότι η απόπτωση μέσω της ακτινοβολίας είναι ένα σύνθετο φαινόμενο [276].

Η p53 όμως φαίνεται να συμμετέχει ανασταλτικά και στη G2/M φάση (G2/M checkpoint) του κυτταρικού κύκλου [279,280], που θεωρείται φάση κλειδί και πιθανώς είναι σημαντικότερη από την G1/S φάση, τουλάχιστον στον καθορισμό της ακτινοευαισθησίας των κυττάρων. Αυτό το συμπέρασμα προήλθε από την παρατήρηση ότι ένα γονίδιο που σχετίζεται ιδιαίτερα με την ευαισθησία που αναπτύσσεται στους παράγοντες καταστροφής του DNA(περιλαμβανομένης της ακτινοβολίας) στους ζυμομύκητες, το rad 9, εκφράζεται κυρίως στη φάση G2 [281]. Μια άλλη παρατήρηση που καθιστά τη φάση G2/M καθοριστική για τον ορισμό της ακτινοευαισθησίας προήλθε από έρευνες επί των μεθυλξανθινών που είναι αποδεδειγμένο ότι δρουν ισχυρά ανασταλτικά στη φάση G2/M και η δράση τους σχετίζεται άμεσα με την ευαισθησία στην ακτινοθεραπεία και σε ραδιο-μιμητικά φάρμακα [282]. Αυτή η ευαισθησία φτάνει στο μέγιστο όταν χορηγηθούν φάρμακα όπως η σισπλατίνη που διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1/S [283,284].

Εάν αυτές οι παρατηρήσεις συνδυαστούν, τότε η παρουσία της p53 μόνο στη φάση G1/S θα πρέπει να σχετίζεται με τους όγκους εκείνους που απαντούν φτωχά στην αντινεοπλασματική θεραπεία και θα πρέπει να υφίσταται και δράση της στη φάση G2/M, προκειμένου να καθοριστεί η πλήρης ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε παράγοντες καταστροφής του DNA περιλαμβανομένης και της ακτινοβολίας.

Το σχήμα 6, απεικονίζει την προτεινόμενη p53-εξαρτώμενη οδό που οδηγεί σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης και σε απόπτωση [285].

Σχήμα 6. Προτεινόμενο μοντέλο της p53 – εξαρτώμενης οδού αναστολής της κυτταρικής αύξησης και απόπτωσης. Η καταστροφή του DNA ευνοεί την έκφραση της p53, ενώ αντιγόνα DNA-ογκογόνων ιών (SV40 large T, adenovirus E1A) ή παλινδρομη αναστολή μέσω της mdm-2, λειτουργούν ως αναστολείς της p53. Η p53 με τη σειρά της προάγει τη έκφραση του γονιδίου που παράγει την p21 WAF1/CIP1 πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει την G1 κυκλίνη-εξαρτώμενη κινάση (CDK): η cip1 (cycle inhibitory protein –1), αναγνωρίζεται με την sdi 1 (senescence –derived inhibitor-1) η οποία φυσιολογικά αυξάνεται μετά από βράχυνση των τελομερών κατά τη διαδικασία της γήρανσης. Το WAF1 αντιστοιχεί στο “wild-type p53-activated fragment-1”. Η αναστολή της CDK αποτρέπει τη φωσφορυλίωση του RB (Retinoblastoma gene), το οποίο δεν μπορεί τότε να απελευθερώσει τον παράγοντα E2F που μαζί με τον DP1 είναι απαραίτητοι για την έκφραση του c-myc. Η αναστολή της έκφρασης του τελευταίου καθηλώνει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1 με αποτέλεσμα αυτός να μην εξελίσσεται και η ανάπτυξη του κυττάρου να σταματά. Αξίζει να σημειωθεί ότι οδοί κυτταρικής αύξησης ανεξάρτητοι από την p53 επίσης ενεργοποιούν την p21 WAF1/CIP1 που αναστέλλει τη CDK, όπως για παράδειγμα τα HL60 κύτταρα που δεν εκφράζουν την p53 αλλά εκφράζουν την p21 WAF1/CIP1 κατά τη διαδικασία διαφοροποίησής τους. Έχει ειπωθεί ότι η απόπτωση ως αποτέλεσμα της βλάβης του DNA έχει άμεση σχέση με την έκφραση της p53 και την καταστολή της Bcl-2 ή προαγωγή του Bax από αυτήν. Τα γονίδια Gadd-45 (growth arrest DNA damage-45) και myd (myeloid differentiation) επίσης ενεργοποιούνται από την p53. Έτσι, η p53 φαίνεται να ρυθμίζει την επισκευή και διαφοροποίηση με δύο μηχανισμούς : α) επιβραδύνοντας τον κυτταρικό κύκλο (μέσω του p21 αναστολέα) και β) ενεργοποιώντας τα ειδικά γονίδια για την επισκευή του κατεστραμμένου DNA και την τελική διαφοροποίηση [286].

Μεταλλάξεις της p53 στο σάρκωμα Ewing

Έγινε κατανοητό από τις προηγούμενες σελίδες ότι ο ρόλος της p53 στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβες του DNA είναι πρωταρχικής σημασίας. Κάθε μετάλλαξη στο αντίστοιχο γονίδιο θα οδηγούσε σε παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης με αποτέλεσμα απώλεια του ελέγχου αυτού και συνέχιση του πολλαπλασιασμού ελαττωματικών κυττάρων ή και προσθήκη νέων μεταλλάξεων με τελική κατάληξη την καρκινογένεση. Επίσης, υπέρ-έκφραση κατασταλτικών για την "άγρια" μορφή της πρωτεΐνης γονιδίων, όπως το mdm-2, θα είχε το ίδιο αποτέλεσμα. Πράγματι, αλλοιωμένη p53 έχει αναγνωριστεί στο 50% περίπου των κακοήθων νεοπλασιών στον άνθρωπο, ενώ η συχνότητα αυτή για τα σαρκώματα ανέρχεται στο 30% [78]. Ποικιλία μεταλλάξεων της έχει αναγνωριστεί στα οστεοσαρκώματα και αφορά αναταξινομήσεις βάσεων, απώλεια γονιδίων και απώλεια της ετερογένειάς της [266].

Αν και στο παρελθόν υποστηρίχτηκε ότι οι μεταλλάξεις της p53 είναι συχνό φαινόμενο στα σαρκώματα Ewing [287], είναι σήμερα αποδεκτό ότι η συχνότητα αυτή δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, ανέρχεται στο 5-20% και μάλιστα αφορά ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, υποδεικνύοντας ότι οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να αντιπροσωπεύουν καθυστερημένες γενετικές αλλαγές, σχετιζόμενες με την εξέλιξη της κακοήθειας [288,289]. Σε μελέτες in-Vitro όμως παρατηρήθηκε ότι η παρουσία μεταλλαγμένης p53 σε νεοπλαστικές κυτταρικές σειρές ήταν και 10 φορές μεγαλύτερη. Επίσης έχει αναφερθεί ότι υπερ-έκφραση του γονιδίου mdm-2 παρατηρήθηκε στο 10 % των σαρκωμάτων Ewing και συσχετιζονταν με προχωρημένο στάδιο της νόσου [290]. Πάντως ο ακριβής ρόλος των "γονιδίων καταπίεσης του όγκου" στο σάρκωμα αυτό δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί και είναι βέβαιο πως απαντά σε ένα μικρό ποσοστό τους [291].

Ο Covar και συν. [291], μελετώντας 37 πρωτοπαθείς όγκους και κυτταρικές σειρές από 19 ασθενείς, βρήκε μόνο 5% συχνότητα μετάλλαξης του p53 γονιδίου στα πρώτα κύτταρα. Επίσης απουσίαζε και η υπερ-έκφραση του mdm-2 γονιδίου. Στη δεύτερη σειρά in-Vitro όμως όπως προαναφέρθηκε, η έκφραση του γονιδίου ήταν μεγάλη. Εντυπωσιακό ήταν ότι η πλειονότητα των μεταλλάξεων του p53 αφορούσε μικρές αλλαγές (missense mutations) στο κωδόνιο 273 (ποσοστό ανερχόμενο στο 60%), οι οποίες προκαλούσαν μόνο μερική διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνης.

Μια άλλη πρόσφατη μελέτη από τον Abudu και συν. [292], ανέφερε υπερ-έκφραση της p53 σε 14% των σαρκωμάτων Ewing που μελετήθηκαν, αλλά καμία σχέση μεταξύ της έκφρασης αυτής και την εντόπιση του όγκου. Ενδιαφέρουσα όμως ήταν η παρατήρηση ότι οι όγκοι που εμφάνισαν υπέρ-έκφραση της πρωτεΐνης βρίσκονταν σε προχωρημένο ήδη στάδιο και ακόμη έδειξαν φτωχότερη απάντηση στη χημειοθεραπεία από αυτούς που δεν εξέφραζαν την p53. Ακόμη η 5ετής, ελεuthέρας νόσου επιβίωση και η συνολική επιβίωση για ασθενείς χωρίς μεταστάσεις, ήταν 66% και 71% αντίστοιχα όταν δεν ανιχνεύονταν υπερ-έκφραση της πρωτεΐνης, ενώ στην αντίθετη περίπτωση το ποσοστό έπεφτε στο 20%. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η υπερ-έκφραση της p53 είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για το σάρκωμα Ewing.

Άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η παθολογική υπερ-έκφραση του γονιδίου mdm-2 δεν παίζει ρόλο στην αναστολή της δράσης της p53 στην εξέλιξη των Ewing [291].

Το μόνο βέβαιο είναι ότι ακόμη υπάρχει σύγχυση για τη συμμετοχή και τον ακριβή ρόλο της p53 στα σαρκώματα Ewing, η οποία χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Ο ρόλος της p53 στη θεραπεία του καρκίνου

Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Πολλά από τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών για το ρόλο της p53 στη διαδικασία της απόπτωσης και επομένως τη θεραπεία του καρκίνου είναι διφορούμενα και μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση. Για παράδειγμα, υπάρχουν έρευνες που απέδειξαν πως οι όγκοι που παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα υπερ-έκφρασης της μεταλλαγμένης p53 δεν απαντούν στην αντινεοπλασματική θεραπεία με την ίδια επιτυχία που απαντούν οι όγκοι εκείνοι που σπάνια εμφανίζουν αυτές τις μεταλλάξεις (πχ. Καρκίνος του μαστού σε αντίθεση με τον καρκίνο των όρχεων αντίστοιχα) [293]. Μέσα στον ίδιο τύπο καρκίνου η παρουσία ή όχι της μεταλλαγμένης p53 έχει συσχετιστεί με κακή ή καλή αντίστοιχα πρόγνωση και απάντηση ή όχι στη θεραπεία. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, τα σαρκώματα μαλακών μορίων, ο όγκος του Willms, και διάφορες λευχαιμίες και λεμφώματα [294]. Έχει επίσης αναφερθεί ότι όλοι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (τουλάχιστον in-Vitro) σε υψηλές δόσεις μπορούν να πυροδοτήσουν τη διαδικασία της απόπτωσης ανεξάρτητα από την παρουσία της p53 [277]. Η ετοποσιδή προκαλεί απόπτωση σε HL60 κύτταρα σε απουσία της p53 και η γ-ακτινοβολία επίσης σε σειρά κυττάρων καρκίνου του παχέως εντέρου [295].

Οι παρατηρήσεις αυτές αποδεικνύουν ότι η p53 είναι μεν πρωταρχικής σημασίας για την έναρξη της απόπτωσης, αλλά δεν είναι πάντα απολύτως απαραίτητη αφού ενδεχομένως υπάρχουν κι άλλες οδοί που οδηγούν σ' αυτή. Η δράση πάντως των αντικαρκινικών παραγόντων διευκολύνεται ιδιαίτερα όταν ο μηχανισμός της απόπτωσης σχετίζεται με την παρουσία της p53 [296] και αυτό μπορεί να αποτελεί το σοβαρότερο λόγο για την επιτυχία ή αποτυχία της θεραπείας.

Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν σε σκέψεις για νέες κατευθύνσεις θεραπείας του καρκίνου όπως : α) η αναγνώριση των μεταλλάξεων της p53 σε συγκεκριμένους όγκους και ο ακριβής καθορισμός της συμπεριφοράς της μπορεί να οδηγήσουν σε θεραπευτικές αποφάσεις, β) παράγοντες οι οποίοι επισκευάζουν ή μιμούνται τη λειτουργία της p53 έχουν δυναμικό αντικαρκινικής δράσης και γ) η αναγνώριση των οδών απόπτωσης που είναι ανεξάρτητοι από την p53 θα οδηγούσε στην παρασκευή νέων δραστικών αντινεοπλασματικών φαρμάκων.

Επιδιόρθωση της λειτουργίας της p53

Η θεραπεία με γονίδια της p53 (gene therapy) έχει αποδειχθεί επιτυχής σε διάφορα καρκινικά μοντέλα αφού πυροδοτεί το μηχανισμό της απόπτωσης. Ρετροϊοί και Αδενοϊοί που εκφράζουν την πρωτεΐνη έχουν δοκιμαστεί και οδήγησαν σε έναρξη της απόπτωσης και αναστολή ανάπτυξης του όγκου σε μη-μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα και σε βασικοκυτταρικά καρκινώματα που στερούνταν της πρωτεΐνης, in-Vitro [297]. Μεταφορά του γονιδίου έχει επίσης επιτευχθεί μέσω λιποσωμάτων, σε καρκίνο του μαστού με παρόμοιο αποτέλεσμα και ίσως και ελαχιστοποίηση των μεταστάσεων [298].

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των αδενοϊών αφορούν την ελάχιστη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλούν, γεγονός που υποδεικνύει τη χαμηλή τοξικότητά τους [299] καθώς και την ικανότητά τους να επιτυγχάνουν υψηλές συγκεντρώσεις του γονιδίου (της τάξης του 10^{12} infectious units per ml). Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι οι αδενοϊοί (όπως και οι μη ιογενείς μεταφορείς γονιδίων) προκαλούν παροδική αύξηση

της p53, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα συστηματικής τοξικότητας λόγω υπερ-έκφρασης της πρωτεΐνης. Αυτό ευνοεί και το συνδυασμό θεραπειών, όπως τη χρήση χημειοθεραπείας μαζί με τη μεταφορά του γονιδίου. Πράγματι, ο συνδυασμός Σισπλατίνης μαζί με έναν Αδενοϊό-μεταφορέα του p53, επαναφέρει την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία σε μεταμοσχευθέντες όγκους με μεταλλαγμένη την πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την καταστολή τους [300,301].

Η παρατήρηση ότι η έκφραση του “άγριου-φυσιολογικού” τύπου της πρωτεΐνης p53 σε όγκους που ήταν αρχικά ανθεκτικοί στη θεραπεία τους καθιστά ευαίσθητους, οδηγεί ευλόγως στη σκέψη ότι χημικοί παράγοντες που επιδιορθώνουν ή μιμούνται τη λειτουργία της θα μπορούσαν να έχουν θεραπευτικά αποτελέσματα, είτε μόνοι είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Αυτή η προσέγγιση είναι ικανή να πραγματοποιηθεί αφού συγκεκριμένα αντισώματα βρέθηκε να ενεργοποιούν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA με τρόπο παρόμοιο με την “άγρια” p53 [302].

Μια άλλη προσέγγιση της επαναφοράς της λειτουργίας της p53 είναι να ενεργοποιηθούν ή να τροποποιηθούν τα μόρια-στόχοι της. Δύο σημαντικότερα γονίδια-στόχοι (“downstream targets”) της πρωτεΐνης είναι το Bcl-2 και το Bax, όπου η καταστολή του πρώτου και η προαγωγή της έκφρασης του δεύτερου έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην έναρξη της απόπτωσης των παθολογικών κυττάρων [303,304]. Επομένως παράγοντες που ανταποκρίνονται σ’αυτές τις δια-δράσεις θα είχαν θεραπευτικά αποτελέσματα ενδεχομένως.

Αποπτωτικές οδοί που δεν συμπεριλαμβάνουν την p53

Η πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία είναι τρέχουσα τεχνική σήμερα, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των συστηματικών εκδηλώσεων και την ανάπτυξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά, ακόμη και οι σύγχρονες τεχνικές δεν είναι πάντα επιτυχείς πιθανώς επειδή διαφορετικοί παράγοντες ασκούν τη δράση τους μέσω παρόμοιων οδών (πχ. μέσω της p53-εξαρτώμενης οδού της απόπτωσης).

Η p53 πυροδοτεί την απόπτωση ακολουθώντας την καταστροφή του DNA. Εάν αυτή η βλάβη είναι ο μόνος παράγοντας που προάγει την έκφραση της πρωτεΐνης, τότε μη βλαβεροί για το DNA θεραπευτικοί παράγοντες μπορεί να ενάρξουν την απόπτωση μέσω οδών ανεξάρτητων από την p53. Η Βινκριστίνη και η Πακλιταξέλη είναι φάρμακα που αποσταθεροποιούν και σταθεροποιούν τα μικροσωληνάρια, αντίστοιχα. Όπως και άλλοι παράγοντες που καταστρέφουν το DNA, τα φάρμακα αυτά βρέθηκε να είναι πολύ πιο τοξικά για τα καρκινικά κύτταρα εκείνα που υπερ-εξέφραζαν τη μεταλλαγμένη p53. Αφού λοιπόν η απόπτωση μπορεί να λάβει χώρα και σε απουσία της p53 από τα κύτταρα, η αναγνώριση των μηχανισμών αυτών αποτελεί πρόκληση για το μέλλον.

Άλλες στρατηγικές θεραπείας

Δεν θα ήταν απαραίτητο όλες οι στρατηγικές θεραπείας να συγκεντρώνονται στην επιδιόρθωση ή υποκατάσταση της λειτουργίας της p53 στο μηχανισμό της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τα αλληλία του p53 γονιδίου, θα μπορούσε κάλλιστα να λειτουργήσει ως αντιγόνο για να προκαλέσει μια ανοσολογική απάντηση του οργανισμού κατά του όγκου [305]. Ακόμη, μπορεί να υπάρξουν θεραπευτικοί παράγοντες που θα είναι ενεργοί μόνο σε απουσία της φυσιολογικής p53. Μια τέτοια προσέγγιση χρησιμοποίησε παθολογικούς αδενοϊούς για την εκλεκτική καταστροφή κυττάρων που δεν εξέφραζαν τη φυσιολογική p53. Ο άγριος τύπος του ιού αυτού κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, την E1B 55K, που ανενεργοποιεί την

p53. Αδενοιοί που δεν εκφράζουν αυτή την πρωτεΐνη δεν μπορούν να επιβιώσουν μέσα σε φυσιολογικά κύτταρα, αλλά μπορούν μέσα σ' εκείνα που δεν περιέχουν τον "άγριο" τύπο της p53. Η πρόκληση της λοίμωξης με τον ιό οδηγεί σε λύση του κυττάρου και περαιτέρω διασπορά του ιού, με αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων εκείνων που περιέχουν τη μεταλλαγμένη p53, ενώ τα φυσιολογικά παραμένουν ανέπαφα. Η στρατηγική αυτή εφαρμόστηκε σε ποντίκια με μεταμοσχευμένους όγκους και είχε επιτυχία.

Η σύνοψη των τεχνικών θεραπείας μέσω της ενεργοποίησης της p53 – εξαρτώμενης οδού της απόπτωσης, καθώς και οι περιορισμοί τους, απεικονίζονται στον πίνακα 7.

Strategies for restoring lost p53 function.				
Strategy	Approach	p53 defect	Potential advantages	Challenges
Gene therapy	Delivery of wild-type p53	Mutated or null p53 or inactivating protein	Broad utility	High penetration and/or bystander effect needed
Gene therapy	Delivery of downstream target gene of p53	Mutated or null p53 Inactivating proteins	Broad utility	High penetration and/or bystander effect needed Identification of best candidate gene
Gene therapy	Delivery of oncogene-specific interacting protein	Certain p53 mutations	Specificity Bystander effect	Complex
Viral therapy	Delivery of defective adenovirus	Mutated or null p53 Inactivating proteins	Broad utility Specificity	Immunogenicity Nonspecific toxicity
Vaccines	Peptide-induced cellular immunotherapy	Certain p53 mutations	Specificity Immunosurveillance	Each mutation requires specific peptide immunization
Small molecule drug	Restoration of mutant p53 function	Certain p53 mutations	Specificity Administration	Restricted utility
Small molecule drug	Blocking of inactivation proteins	Overexpressed inactivating proteins	Specificity Administration	Restricted utility Unknown normal cellular function

Πίνακας 7. Προοπτικές θεραπευτικής προσέγγισης του σαρκώματος Ewing, μέσω ενεργοποίησης της p53 – εξαρτώμενης οδού της απόπτωσης και οι περιορισμοί τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σάρκωμα Ewing είναι ένας ευκρινής όγκος που αποτελείται από μικρά, στρόγγυλα κύτταρα και εντοπίζεται συνήθως στα μακρά οστά σκελετικά ανώριμων ασθενών. Ο όγκος αποτελείται από αδιαφοροποίητα, στρόγγυλα, μεσεγχυματικά κύτταρα που είναι πλούσια σε γλυκογόνο και εμφανίζουν μια ανωμαλία του καρυοτύπου τους που προέρχεται από την ανταλλαγή των δεσμών q24 και q12, μεταξύ των χρωμοσωμάτων 11 και 22 αντίστοιχα, [reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12)], που οδηγεί στην έκφραση μιας χμαιρικής πρωτεΐνης, της EWS/FLI-1 πρωτεΐνης. Αυτή η γενετική ανωμαλία εντοπίζεται στο 90% των σαρκωμάτων Ewing[17].

Ο όγκος αυτός περιγράφηκε αρχικά από τον James Ewing το 1921, ο οποίος και παρατήρησε τη μεγάλη ευαισθησία του στην ακτινοβολία, που αποτέλεσε και την πρώτη μέθοδο θεραπείας του. Το γεγονός ότι το σάρκωμα Ewing είναι από τους συχνότερα εμφανιζόμενους όγκους στα παιδιά, (ο δεύτερος πιο συχνός πρωτοπαθής κακοήθης όγκος της παιδικής ηλικίας και ο τέταρτος πιο συχνός όγκος των οστών συνολικά), καθώς και η δραματική πρόγνωσή του, έστρεψαν από νωρίς το ενδιαφέρον των ερευνητών προς αυτό [18].

Επί σειρά δεκαετιών και πριν την είσοδο της χημειοθεραπείας στην αντιμετώπιση του όγκου, η πρόγνωσή του όσον αφορά την 5-ετή επιβίωση, δεν ξεπερνούσε το 5%. Το πρώτο ολοκληρωμένο χημειοθεραπευτικό σχήμα, αποτελούμενο από Vincristin, Actinomycin D και Cyclophosphamide (VAC), σε συνδυασμό με ακτινοβολία δοκιμάστηκε μόλις το 1969 από τους Johnson και Humphreys [4] που ανέφεραν και ιδιαίτερα βελτιωμένη επιβίωση των ασθενών τους με σάρκωμα Ewing. Μερικά χρόνια αργότερα στο παραπάνω σχήμα προστέθηκε και η Doxorubicin (VACA), από τον Rosen et al.[6] που οδήγησε σε περαιτέρω βελτίωση της πρόγνωσης.

Η πρόοδος των χειρουργικών τεχνικών, με τη βοήθεια της αξονικής και μαγνητικής τομογραφίας για την ακριβέστερη σταδιοποίηση του όγκου, νέοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες όπως η ετοποσίδη και η ιφωσφαμίδη [12] και νέα σχήματα θεραπείας, η χρήση προ-εγχειρητικής (neo-adjuvant) χημειοθεραπείας[13], η μεταμόσχευση μυελού των οστών[14] ή αρχέγονων περιφερικών κυττάρων του αίματος[15] σε συνδυασμό με υψηλές δόσεις χημειοθεραπευτικών παραγόντων καθώς και η πρόοδος της ακτινοθεραπείας, έχουν οδηγήσει σε βελτίωση της 5-τους επιβίωσης στο ποσοστό του 70%, σήμερα [2].

Η εξέλιξη της Μοριακής Βιολογίας επίσης, οδήγησε σε πιο λεπτομερή γνώση της παθολογίας του σαρκώματος Ewing, καθώς και των μηχανισμών και μονοπατιών απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε, η χρωμοσωμική δια-ανταλλαγή t(11;22)(q24;q12) απαντά στη συντριπτική πλειοψηφία των σαρκωμάτων Ewing. Η πρόσφατη ανακάλυψη των ογκογονιδίων [254], έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών και σε άλλες οδούς αντιμετώπισης των κακοηθειών, με αντικατάσταση των αλλοιωμένων και επομένως ανεπαρκών αντικαρκινικών γονιδίων, καθώς και με καταπίεση ή εξάλειψη των ογκογενετικών (Gene therapy).

Η p53, εκφραζόμενη από το αντίστοιχο γονίδιο, θεωρείται μία από τις βασικότερες πρωτεΐνες που ανευρίσκονται αλλοιωμένες στα καρκινικά κύτταρα και απαντά περίπου στο 30% των σαρκωμάτων. Ελάχιστες είναι ακόμη οι αναφορές σχετικά με το ρόλο της πρωτεΐνης αυτής, καθώς και με την παρουσία της σε σχέση με την πρόγνωση των σαρκωμάτων Ewing.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 (HSP70), εξασφαλίζουν τη συντονισμένη ρύθμιση της πρωτεϊνικής δια-μεταφοράς, την μεταφορά και πτύχωση τους [225] και ελαχιστοποιούν την κυτταρική καταστροφή μετά από στρες με την ιδιότητά τους να εμποδίζουν την

πρωτεϊνική συνάθροιση στην κυτταρική μεμβράνη και να επιδιορθώνουν τη λειτουργία των μετουσιωμένων πρωτεϊνών [226]. Ο ρόλος τους επομένως είναι προστατευτικός για το κύτταρο που βρίσκεται υπό στρες, είτε αυτό είναι θερμικό, είτε αποτέλεσμα της εναγόμενης χημειοθεραπείας.

Μελέτες για το ρόλο της παρουσίας ή μη των HSP70 στα καρκινικά κύτταρα του σαρκώματος Ewing και η συσχέτισή τους με την πρόγνωση και την κλινική πορεία της νόσου, δεν έχουν αναφερθεί ως τώρα.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανίχνευση με ανοσοιστοχημικές μεθόδους της παρουσίας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 (HSP70) καθώς και της πρωτεΐνης p53, στα καρκινικά κύτταρα ασθενών με διαγνωσμένο σάρκωμα Ewing, και η συσχέτισή τους με την κλινική πορεία της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, με την παρουσία μεταστάσεων ή μη, την εμφάνιση υποτροπών της νόσου ή μη και την συνολική επιβίωση.

Ακόμη, σκοπός ήταν και η επιδημιολογική, κατά το δυνατόν, ανάλυση εμφάνισης της νόσου στη χώρα μας καθώς και η μελέτη γνωστών κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων πρόγνωσης.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κατά τη διάρκεια της 15-ετίας από το 1985 έως και το 2000, τα ονόματα 37 ασθενών με διαγνωσμένο σάρκωμα Ewing, ανακλήθηκαν από τα αρχεία του παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Νοσοκομείου Παιδών των Αθηνών, "Αγία Σοφία". Μπλοκ παραφίνης με τον παθολογικό ιστό συγκεντρώθηκαν για ανοσοιστοχημική μελέτη. Οι φάκελοι με τις κλινικές σημειώσεις και οι ακτινογραφίες των ασθενών αυτών, επίσης μελετήθηκαν. Τα παραπάνω στοιχεία τριών από τους ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν στο εξωτερικό δεν μπόρεσαν να συγκεντρωθούν. Ακόμη, οι φάκελοι με τις κλινικές σημειώσεις από άλλους τέσσερις ασθενείς δεν εντοπίστηκαν και ένας ακόμη δεν περιείχε επαρκή στοιχεία οπότε εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Τελικά, 30 από τους παραπάνω ασθενείς συμπλήρωναν τα κριτήρια εισαγωγής και συμπεριλήφθηκαν σ' αυτή την αναδρομική μελέτη.

Ο μέσος όρος ηλικίας των νεαρών ασθενών ήταν 10.5 έτη (διακύμανση 2-18 έτη). Οι 14 από αυτούς ήταν ηλικίας μέχρι και 10 ετών και οι υπόλοιποι 16, ήταν μεγαλύτεροι. Οι 19 (63%) ήταν αγόρια και οι 11 (37%) κορίτσια. Η εντόπιση του όγκου αφορούσε τον αξονικό σκελετό (λεκάνη, σπονδυλική στήλη, θωρακικό τοίχωμα), στους 15 από αυτούς (50%) και τον περιφερικό (άνω και κάτω άκρα) στους υπολοίπους. Πιο συγκεκριμένα, 9 (30%) από τους όγκους εντοπίζονταν στη λεκάνη, ένας από τους οποίους είχε επινεμέσει και τους τρεις κατώτερους ιερούς σπονδύλους κατά τη στιγμή της διάγνωσης, 6 (20%) στο θωρακικό τοίχωμα, 5 (17%) στο μηριαίο, 6 (20%) στην κνήμη, 3 (10%) στο βραχιόνιο και 1 (3%) στο άκρο χέρι. Το χρονικό διάστημα από την εμφάνιση των συμπτωμάτων μέχρι τη διάγνωση ήταν μικρότερο ή ίσο των 3 μηνών σε 21 (70%) και μεγαλύτερο των 3 μηνών σε 9 (30%) από τους ασθενείς. (Γραφήματα Α,Β,Γ).

Ο μέσος χρόνος επανεξέτασης ήταν 7.2 χρόνια (διακύμανση 3 – 16 χρόνια).

Η καταγωγή των ασθενών ήταν από την κεντρική και νότιο Ελλάδα κυρίως, καθώς και από τα νησιά. Έντεκα από αυτούς (37%) προέρχονταν από την Αττική, 10 (33%) από την υπόλοιπη κεντρική Ελλάδα, 2 (7%) από την Πελοπόννησο και 7 (23%) από τα ελληνικά νησιά. Αξιοσημείωτο είναι ότι 4 (13.5%) από τους ασθενείς είχαν καταγωγή το Αργίνιο και 3 (10%) τη Λαμία. Οικογενειακό ιστορικό κακοήθειας σε συγγενείς πρώτου και δεύτερου βαθμού ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 17% και 8 (27%) από τις μητέρες των παιδιών είχαν ιστορικό τουλάχιστον μίας αποβολής και ελάμβαναν ορμονοθεραπεία. Δύο ασθενείς είχαν ιστορικό προηγούμενου Ca ωοθηκών και άλλοι δύο είχαν συγγενείς ανωμαλίες όπως αρθρογρύπωση και λυκόστομα.

Η κλινική παρουσίαση αφορούσε πόνο στην περιοχή του όγκου σε ποσοστό 80%, διόγκωση σε ποσοστό 70% και πυρετό στο 30% των ασθενών. Χαρακτηριστική ήταν η εμφάνιση πυρετού σε εντόπιση του όγκου κυρίως στο θωρακικό τοίχωμα, όπου 5 από τους 6 συνολικά ασθενείς παρουσίασαν εμπύρετο και πόνο. Δύο από τους ασθενείς ανέφεραν ιστορικό προηγούμενου τραύματος και άλλοι δύο αντιμετωπίστηκαν αρχικά με τη διάγνωση οστεομυελίτιδας. Δεν υπήρξε παθολογικό κάταγμα. Ο ασθενής με τον όγκο στη λεκάνη και το ιερό παρουσίασε οσφυαλγία και ακράτεια ούρων ως αρχικά συμπτώματα.

Γράφημα Α. Ποσοστιαία κατανομή της εντόπισης του πρωτοπαθούς όγκου

Γράφημα Β. Κατανομή του όγκου κατά ηλικία και γένος

Γράφημα Γ. Μέσος χρόνος καθυστέρησης στη διάγνωση από την έναρξη των συμπτωμάτων.

Κατά την εργαστηριακή διερεύνηση, 9 ασθενείς εμφάνιζαν αναιμία κατά τη διάγνωση, 5 λευκοκυττάρωση από τους οποίους μόνο 2 πολυμορφοπυρήνωση, 6 εμφάνιζαν αυξημένη ΤΚΕ και 12 αυξημένη γαλακτική δευδρογενάση (LDH). Οι 7 από τους 9 ασθενείς με εντόπιση στη λεκάνη είχαν αυξημένο τον τελευταίο εργαστηριακό δείκτη. (Πίνακας 1)

Δέκα από τους ασθενείς (33%), εμφάνιζαν απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά τη διάγνωση. Οι τέσσερις από αυτούς (40%) είχαν μεταστάσεις μόνο στους πνεύμονες, οι δύο από τους οποίους αμφοτερόπλευρα, οι 2 (20%) είχαν στα οστά και τον μυελό των οστών και άλλοι 2 (20%) είχαν συνδυασμό μεταστάσεων στους πνεύμονες και στα οστά / μυελό των οστών. Ένας εμφάνισε μεταστάσεις στους περιοχικούς λεμφαδένες και ένας ακόμη στο ήπαρ. Οι υπόλοιποι 20 ασθενείς χωρίς μεταστάσεις, εμφάνιζαν εξωδιαμερισματική επέκταση του όγκου κατά τη διάγνωση (στάδιο III B κατά Enneking).

Κλινικά / Εργαστηριακά ευρήματα	Αριθμός ασθενών	Εντόπιση
Πόνος	24	Διάφορη
Διόγκωση	21	Διάφορη
Επώδυνη διόγκωση	16	Διάφορη
Εμπύρετο	9	5/6 των όγκων του θώρακα
Οσφυαλγία / Ακράτεια ούρων	1	Λεκάνη και Ιερό οστού
Αναιμία	9	4 Λεκάνη / 4 Θώρακας
Λευκοκυττάρωση	5	4 Θωρακικό τοίχωμα
Πολυμορφοπυρήνωση	2	Διάφορη
Αυξημένη ΤΚΕ	6	3 Λεκάνη
Αυξημένη LDH	12	7/9 των όγκων Λεκάνης

Πίνακας 1. Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα σε συσχέτιση με την εντόπιση του σαρκώματος Ewing και ο αντίστοιχος αριθμός των ασθενών. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση εμπύρετου κατά την εντόπιση του όγκου στο θώρακα, καθώς και η αύξηση της LDH κατά την εντόπιση στην πύελο. Αναιμία παρατηρήθηκε σε σημαντικό ποσοστό και των δύο παραπάνω ομάδων.

Όλοι οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση της συστηματικής νόσου, πριν από την προσπάθεια ελέγχου της τοπικής νόσου (Neo-adjuvant Chemotherapy). Ο μέσος χρόνος χημειοθεραπείας ήταν 10-12 εβδομάδες και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν Vincristine, Adriamycin και Cyclophosphamide (VAC), ή Vincristine, Actinomycin D, Cyclophosphamide και Doxorubicin (VACA) σε συνδυασμό με Etoposide ή Ifosfamide στις περιπτώσεις εκείνες που η νόσος ήταν ήδη μεταστατική. Μεγαθεραπεία με μεταμόσχευση αυτόλογου μυελού των οστών δεν χρησιμοποιήθηκε για τη μεταστατική κατά τη διάγνωση νόσο. Όλοι οι ασθενείς, εκτός από 4, έλαβαν χημειοθεραπεία με τα παραπάνω σχήματα, μετά την προσπάθεια ελέγχου της τοπικής νόσου, για χρονικό διάστημα από 6 – 12 μήνες. Οι 4 ασθενείς που δεν έλαβαν χημειοθεραπεία, αντιμετωπίστηκαν ακτινοθεραπευτικά με δόσεις από 40-60 cGy (μ.ο 50cGy).

Εκτός από την αρχική βιοψία για τη διάγνωση, 26 ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική αντιμετώπιση του όγκου μετά την αρχική χημειοθεραπεία. Οι 16 από αυτούς αντιμετωπίστηκαν ριζικά, με ακρωτηριασμό (3), ευρεία εκτομή και ενδοπρόθεση (4) και ευρεία εκτομή με ανακατασκευή του οστού (9). Οι 4 από αυτούς έλαβαν και ακτινοθεραπεία μετά τη χειρουργική επέμβαση. Από τους υπόλοιπους 10, οι 4 αντιμετωπίστηκαν με οριακή εκτομή και οι 6 με τοπική εκτομή, όπου επιτεύχθηκαν αρνητικά όρια. Οι 8 από την τελευταία ομάδα ασθενών έλαβαν μετεγχειρητικά ακτινοβολία, με δόσεις που κυμάνθηκαν από 35-50 cGy. (Πίνακας 2)

Ακτινοβολία έλαβαν συνολικά 16 ασθενείς. Στην περίπτωση πνευμονικών μεταστάσεων και οι δύο πνεύμονες ακτινοβολήθηκαν μόνο στην περίπτωση αμφοτερόπλευρης εντόπισης. Οι δόσεις κυμάνθηκαν από 35-60 cGy (μ.ο 45 cGy).

	Χημειοθεραπεία	Βιοψία	Ριζική Χειρουργική αφαίρεση	Περιορισμένη Χειρ. Αφαίρεση
	N = 26	N = 4	N = 16	N = 10
Με Ακτινοθεραπεία	N = 16	N = 4	N = 4	N = 8
Χωρίς Ακτινοθεραπεία	N = 10	N = 0	N = 12	N = 2

Πίνακας 2. Πρωτόκολλα θεραπείας των ασθενών. Όλοι οι ασθενείς που δεν έλαβαν χημειοθεραπεία, μετεγχειρητικά αντιμετωπίστηκαν με ακτινοβολία της εστίας του πρωτοπαθούς όγκου. Οι περισσότεροι από αυτούς που δεν αντιμετωπίστηκαν με ριζική χειρουργική εκτομή, έλαβαν επίσης ακτινοβολία μετεγχειρητικά.

Η απάντηση του όγκου στη Neo-adjuvant χημειοθεραπεία δεν καθορίστηκε μετεγχειρητικά, καθώς επίσης και ο ακριβής όγκος του σαρκώματος. Υπήρξαν όμως στοιχεία όσον αφορούσε τη μέγιστη διάμετρο του όγκου, η οποία ήταν μεγαλύτερη από 8cm σε ποσοστό 67% (20 ασθενείς).

Υποτροπή του όγκου παρουσίασαν 16 (53%) από τους ασθενείς. Σε 7 (43.75%) από αυτούς η υποτροπή ήταν τοπική στο ίδιο οστόύν, σε 3 (από τους οποίους 2 στη Σ.Σ και 1 στους πνεύμονες) ήταν τοπική και απομακρυσμένη και στους υπόλοιπους 6 (37.5%) η μετάσταση ήταν στους πνεύμονες. Ο μέσος χρόνος υποτροπής της νόσου ήταν 18 μήνες (διακύμανση 3 - 48 μήνες). Σε 4 ασθενείς η υποτροπή του όγκου εμφανίστηκε μετά τα 2 έτη, ενώ στους υπόλοιπους 12 νωρίτερα. Η θεραπεία των όγκων που υποτροπίασαν περιελάμβανε χημειοθεραπεία (όπου φάρμακα όπως η Melphalan, Busulphan, Bleomycin και Cisplatin προστέθηκαν στα προηγούμενα σχήματα), ακτινοθεραπεία και προσπάθεια χειρουργικής εκτομής, σε διάφορους συνδυασμούς.

Παράμετροι όπως η ηλικία, το γένος, η κεντρική ή περιφερική εντόπιση του όγκου, η καθυστέρηση στη διάγνωση πέραν των 3 μηνών, η παρουσία αναιμίας, αυξημένης ΤΚΕ

και LDH κατά τη διάγνωση, ελέγχθηκαν σε σχέση με την πρόγνωση. Ακόμη η παρουσία μεταστάσεων κατά τη διάγνωση καθώς και η υποτροπή σχετίστηκαν με την πρόγνωση. Η αρχική εντόπιση του όγκου κεντρικά ή περιφερικά σχετίστηκε με την υποτροπή ή μη της νόσου. Ακόμη, η υποτροπή πριν ή πέραν των δύο ετών μετά την αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς νόσου, με την πρόγνωση. Η έκφραση της p53 σχετίστηκε με την παρουσία ή μη μεταστάσεων, την υποτροπή της νόσου και με την συνολική επιβίωση.

Το Chi Square test χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί η σχέση των ανωτέρω παραμέτρων.

Ως συνολική επιβίωση, ορίστηκε το χρονικό διάστημα από τη διάγνωση του σαρκώματος έως το θάνατο του ασθενούς ή ως την τελευταία επανεξέταση.

Ως επιβίωση ελευθέρως νόσου, ορίστηκε το χρονικό διάστημα από την ολοκλήρωση της αρχικής θεραπείας ως την υποτροπή της νόσου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η ανοσοιστοχημική ανίχνευση της HSP 70

Τμήματα του όγκου είχαν μονιμοποιηθεί σε 10% ουδέτερη φορμόλη για 24 ώρες και εν συνεχεία αφυδατώθηκαν αφού πέρασαν σταδιακά από 50%, 75%, 80% και 96%, διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης και εν συνεχεία από απόλυτη αλκοόλη και ξυλόλη. Τελικώς σκηνώθηκαν σε κύβους παραφίνης.

Τομές κόπηκαν και βάφτηκαν με τη συμβατική χρώση ηωσίνης – αιματοξυλίνης για να ελεγχθεί η μορφολογία του όγκου και η κατάσταση στην οποία βρίσκεται.

Άβαφες τομές πάχους 4μm κόπηκαν επίσης από αντιπροσωπευτικές θέσεις του όγκου προκειμένου να βαφούν ανοσοιστοχημικά με αντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70 (HSP 70). Μια τριών επιπέδων διαδικασία χρώσης ανοσουπεροξειδάσης χρησιμοποιήθηκε. Οι τομές αποπαραφινολοιήθηκαν με τη χρήση αλκοόλης και στη συνέχεια εμβυθίστηκαν σε ένα φωσφορικό – αλατούχο διάλυμα εξουδετέρωσης (buffer), και σε μεθανόλη με 0.5% υπεροξείδιο του υδρογόνου προκειμένου να δεσμευτεί η ενδογενής δραστηριότητα της υπεροξειδάσης. Η ανάδειξη των αντιγόνων υποβοηθήθηκε με υγρή αποστείρωση (10 λεπτά, 1 bar) των τομών σε κιτρικό εξουδετερωτή (0.5 mmol / L, pH6) [306]. Στη συνέχεια, πολυκλωνικά αντισώματα της Dako, εφαρμόστηκαν στο διάλυμα σε αραιώση 1: 250 και αφέθηκαν 24 ώρες για να επωασθούν στους 4 βαθμούς Κελσίου, σε υγρό περιβάλλον. Η παραπάνω αραιώση επιλέχθηκε έπειτα από σειρά πειραμάτων χρώσεως, με διαφορετική αραιώση κάθε φορά. Αυτές οι επανειλημμένες χρώσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την Dako strept-ABC- HRP μέθοδο. Καλλιεργημένα επιθηλιακά θυρεοειδικά κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε θερμικό σοκ (42 βαθμούς Κελσίου για 90 λεπτά) ή όχι (37 βαθμοί Κελσίου), χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί ή αρνητικοί δείκτες αντίστοιχα [307].

Οι ανοσοιστοχημικά χρωσμένες τομές μελετήθηκαν από τον Καθηγητή κ. Δ.Αρβανίτη, στο απλό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα ορίστηκαν ως θετικά (+) ή αρνητικά (-). Θετικές ορίστηκαν οι περιπτώσεις εκείνες στις οποίες τουλάχιστον το 15% των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων είχε χρωσθεί ανοσοιστοχημικά [308].

Η προσπάθεια ανοσοιστοχημικής ανίχνευσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 (HSP 70) απέβη αρνητική, δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη.

Η ανοσοιστοχημική ανίχνευση της p53

Τομές 4μm από τα σκηνωθέντα σε κύβους παραφίνης τεμάχια βιοψίας του όγκου, ελήφθησαν και σ' αυτή την περίπτωση και σταθεροποιήθηκαν σε θετικά φορτισμένα πλακάκια. Η δραστηριότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης εξουδετερώθηκε κι εδώ με την εμβάπτιση σε διάλυμα αιθανόλης με 5% υπεροξείδιο του υδρογόνου, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάδειξη των αντιγόνων επιτελέστηκε με την εισαγωγή των πλακιδίων σε φούρνο μικροκυμάτων για 20 λεπτά στα 800 watt. Ένα στάδιο εξουδετέρωσης με φυσιολογικό ορό κουνελιού εφαρμόστηκε. Το πρωτογενές αντίσωμα εφαρμόστηκε για 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με διάλυμα εξουδετέρωσης σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν αντενεργοί από το σύστημα En Vision + και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Οι τομές ξεπλύθηκαν πάλι με ένα εξουδετερωτή και στη συνέχεια υποβλήθηκαν στην επίδραση διαλύματος που περιείχε 0.05% υδροχλωρική διαμινοβενζιπίνη και 0.1% υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε 0.05 mol / L τριπλο-εξουδετερωμένο φυσιολογικό ορό, με pH 7.4, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από νέο ξέπλυμα σε αποσταγμένο νερό για 3 λεπτά οι τομές αφυδατώθηκαν και εφίπνεύτηκαν. Για έλεγχο αρνητικού αποτελέσματος έγινε επώαση με ορό φυσιολογικής γίδας, αντί του πρωτογενούς αντισώματος.

Για την ανοσοιστοχημική ανίχνευση της p53, χρησιμοποιήσαμε τα DO7 μονοκλωνικά αντισώματα (Novocastra / Atom) σε αραιώση 1: 1600.

Η ανοσοιστοχημική ανίχνευση της p53 έδειξε αρνητικό αποτέλεσμα σε 12 (40%) ασθενείς (Εικ. 1), σε άλλους 14 (47%) η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε ποσοστό μικρότερο του 20% των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων (Εικ. 2) και σε 4 (13%) ασθενείς η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε χρωματίζοντας περισσότερους από το 20% των πυρήνων (Εικ 3), γεγονός που υποδήλωνε παρουσία μετάλλαξης της πρωτεΐνης [309].

Η ανοσοιστοχημική χρώση των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων απεικονίζεται στο 'ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ'', στο τέλος του κειμένου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δέκα επτά (56.6%) από τους 30 ασθενείς τελικά απεβίωσαν. Ο μέσος χρόνος επιβίωσής τους ήταν 21.8 μήνες (διακύμανση 6-30 μήνες). Είκοσι ένας ασθενείς (70%) παρουσίασαν μεταστάσεις, από τους οποίους οι 10 (33%) είχαν μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Η αναλογία αγοριών / κοριτσιών ήταν 1.8 : 1. Η συμμετοχή του αξονικού προς τον περιφερικό σκελετό ήταν ισότιμη, με τους πιο πολλούς όγκους δε, να εμφανίζονται στην πύελο (30%). Η εμφάνιση του όγκου στην πρώτη ή δεύτερη δεκαετία της ζωής δεν παρουσίασε ιδιαίτερη διακύμανση.

Παρόλο που η προέλευση των ασθενών αφορούσε μόνο την κεντρική και νότιο Ελλάδα και τα νησιά (και σαφώς υπήρξαν διαφυγόντα περιστατικά), περιοχές όπως το Αργίριο (13.5% από τους ασθενείς) και η Λαμία (10% από τους ασθενείς) παρουσίασαν μεγαλύτερη συχνότητα προέλευσης των ασθενών.

Παρόλο που δεν υπολογίστηκε η στατιστική συσχέτιση του οικογενειακού ιστορικού με την εμφάνιση του σαρκώματος Ewing, χαρακτηριστικό ήταν ότι το ποσοστό εμφάνισης κακοήθειας σε συγγενείς Α' και Β' βαθμού ήταν 17%, καθώς και το ότι 27% των μητέρων των ασθενών είχαν τουλάχιστον μία αποβολή στο παρελθόν και είχαν λάβει ορμονοθεραπεία. Δύο (6.7%) από τους ασθενείς είχαν προηγούμενο ιστορικό κακοήθειας ανεξάρτητης από το σάρκωμα Ewing. Δύο (6.7%) από τους ασθενείς αντιμετωπίστηκαν αρχικά με τη διάγνωση οστεομυελίτιδας, γεγονός που καθυστέρησε την αντιμετώπισή τους πέραν των τριών μηνών. Ποσοστό 83% από τους ασθενείς με εντόπιση του όγκου στο θωρακικό τοίχωμα εμφάνισαν εμπύρετο και ποσοστό 77.7% από τους ασθενείς με εντόπιση στην πύελο είχαν υψηλή Γαλακτική Δευδρογενάση (LDH) στον ορό.

Η εντόπιση του όγκου κεντρικά (πύελος και θωρακικό τοίχωμα), βρέθηκε να έχει στατιστική συσχέτιση με την 5-ετή επιβίωση των ασθενών ($p=0.028$), καθώς και με την εμφάνιση υποτροπής του όγκου ($p=0.025$). Η ηλικία των ασθενών (έως και δέκα ετών / άνω των δέκα ετών), καθώς και η καθυστέρηση της διάγνωσης και της αρχικής αντιμετώπισης άνω των 3 μηνών, δεν βρέθηκε να επηρεάζει την πρόγνωση όσον αφορούσε την 5-ετή επιβίωση ($p=0.269$ και $p=0.338$, αντίστοιχα). Ανεξάρτητο της επιβίωσης ήταν επίσης και το φύλλο των ασθενών. Η παρουσία αναιμίας επίσης δεν βρέθηκε να επηρεάζει την πρόγνωση, $p=0.523$, ενώ η αυξημένη LDH του ορού είχε μικρή στατιστική συσχέτιση με την 5-ετή επιβίωση ($p=0.062$).

Η παρουσία σύγχρονων μεταστάσεων κατά τη διάγνωση, καθώς και η υποτροπή του όγκου, επηρέαζαν σημαντικά την πρόγνωση για 5-τη επιβίωση των ασθενών (p values, 0.002 και 0.001 αντίστοιχα). Η παρουσία των αρχικών μεταστάσεων είχε συσχέτιση και με τη συχνότητα εμφάνισης των υποτροπών της νόσου ($p=0.002$). Ο χρόνος εμφάνισης των μεταστάσεων κατά την υποτροπή της νόσου, βρέθηκε επίσης να έχει συσχέτιση με την πρόγνωση, με τους ασθενείς που εμφάνιζαν υποτροπή μετά τα δύο χρόνια από το πέρας της αρχικής θεραπείας, να παρουσιάζουν 3-ετή επιβίωση σε σαφώς μεγαλύτερο ποσοστό ($p=0.001$).

Η μέγιστη διάμετρος του όγκου πέραν των 8cm, είχε σχέση με τη συνολική επιβίωση ($p=0.05$), και με την εμφάνιση υποτροπής της νόσου ($p=0.043$), αλλά όχι με την παρουσία αρχικών μεταστάσεων. Πίνακας 3.

		Ασθενείς N= 30	5χ ΣΕ	P value	3χ EEN	P value
Εντόπιση όγκου	Κεντρικά Περιφερικά	N=15 N=15	20% 66.6%	0.028	20% 60%	0.025
Ηλικία ασθενών	<= 10 ετών > 10 ετών	N=14 N=16	42.3% 43.75%	0.269	--	--
Φύλλο ασθενών	Αγόρια Κορίτσια	N=19 N=11	42.1% 44.2%	0.763		
Καθυστ. Διάγνωσης	<= 3 μηνών > 3 μηνών	N=21 N=9	47.6% 33.3%	0.338		
Αναιμία	Ναι Όχι	N=9 N=21	44.4% 43.7%	0.523		
Αυξημένη LDH	Ναι Όχι	N=12 N=18	25% 55.7%	0.062		
Σύγχρονες μεταστάσεις	Ναι Όχι	N=10 N=20	10% 60%	0.002	10% 60%	0.002
Υποτροπή όγκου	Ναι Όχι	N=16 N=14	12.5% 78.57%	0.001		
Υποτροπή όγκου	<= 2 ετών > 2 ετών	N=13 N=3	15.3% 100%	0.001		
Μέγιστη διάμετρος	<= 8 cm > 8 cm	N=10 N=20	60% 35%	0.05	70% 30%	0.043

Πίνακας 3. Στατιστική ανάλυση κλινικο-εργαστηριακών παραμέτρων και της πρόγνωσης του σαρκώματος Ewing. (ΣΕ = Συνολική επιβίωση, EEN = Επιβίωση Ελευθέρας Νόσου)

Η έκφραση (+) ή όχι (-) της p53, δεν βρέθηκε να επηρεάζει την 5-τη πρόγνωση (p=0.532) αλλά η υπερ-έκφρασή της (σε ποσοστό άνω του 20% των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων, γεγονός που υποδήλωνε μετάλλαξη [13]), επηρέαζε την πρόγνωση των ασθενών αυτών, p=0.039. Σημαντική ήταν επίσης η συσχέτιση της υπερ-έκφρασης της πρωτεΐνης με την εμφάνιση υποτροπής της νόσου, p=0.006, ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ύπαρξη αρχικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση (p=0.078). Πίνακας 4.

		Ασθενείς N=30	5 χ. ΣΕ	P value	3 χ. EEN	P value
Έκφραση p53	Όχι (-)	N=12	58.4%	0.532		
	Ναι (+)	N=18	33.4%			
Έκφραση p53	Όχι (-)	N=12	58.4%	0.039	75%	0.006
	Υπέρ (++, >20%)	N=4	25%		25%	

Πίνακας 4. Στατιστική συσχέτιση της έκφρασης της p53, με την 5-ετή Συνολική Επιβίωση (ΣΕ) και με την Επιβίωση Ελευθέρας Νόσου (EEN) στο σάρκωμα Ewing.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σάρκωμα Ewing είναι ο δεύτερος πιο συχνός πρωτοπαθής κακοήθης όγκος της παιδικής ηλικίας και ο τέταρτος πιο συχνός όγκος των οστών συνολικά [18]. Από το 1921, που πρώτος ο James Ewing περιέγραψε τον όγκο που φέρει το όνομά του, παρατηρώντας ταυτόχρονα ότι ήταν ακτινοευαίσθητος σε αντίθεση με το οστεοσάρκωμα, η θεραπευτική αντιμετώπιση της συχνής αυτής κακοήθειας της παιδικής ηλικίας πέρασε διάφορα στάδια.

Σήμερα είναι γενικά παραδεκτό ότι ο όγκος έχει χαρακτήρες συστηματικής νόσου και θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως τέτοια. Η είσοδος στην αντιμετώπισή του της συστηματικής Neo – adjuvant χημειοθεραπείας, η χρήση νέων ισχυρών πολυπαραγοντικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων με την ταυτόχρονη μεταμόσχευση αυτόλογου μυελού των οστών ή αρχέγονων κυττάρων του αίματος, καθώς και με την υποστήριξη του Παράγοντα Ενεργοποίησης του Κλώνου Κοκκιοκυττάρων (Granulocyte Colony Stimulating Factor-GCSF-), η πρόοδος της ακτινοθεραπείας και η εξέλιξη νέων χειρουργικών τεχνικών διατήρησης του μέλους, οδήγησε σε θεαματική βελτίωση της πρόγνωσης και μείωση της νοσηρότητας τα τελευταία 30 χρόνια. Παρόλα αυτά όμως η 5-της επιβίωση των ασθενών δεν ξεπερνάει το 70%, ενώ η πρόγνωση για τη μεταστατική ή την υποτροπιάζουσα νόσο είναι πολύ χειρότερη [104,105,106].

Νέες μελέτες ανά τον κόσμο έχουν τα τελευταία χρόνια επικεντρωθεί στη θεραπεία του όγκου σε μοριακό ή γονιδιακό επίπεδο (gene therapy), προσπαθώντας να εντοπίσουν τα “λανθασμένα” εκείνα γονίδια, η έκφραση των οποίων έχει σχέση με τη συγκεκριμένη καρκινογένεση, καθώς και τις οδούς εξέλιξης της κακοήθειας προκειμένου να την αντιμετωπίσουν [16].

Κάθε έρευνα σ’ αυτό το επίπεδο επομένως θεωρείται σημαντική και θέτει ακόμη ένα λίθο στο στερέωμα της σύγχρονης μοριακής βιολογίας για την αντιμετώπιση του όγκου.

Σ’ αυτή την αναδρομική έρευνα προσπαθήσαμε να μελετήσουμε, κατά το δυνατόν, επιδημιολογικούς χαρακτήρες του σαρκώματος Ewing στη χώρα μας, να αναλύσουμε κλινικούς και εργαστηριακούς παράγοντες σε σχέση με την πρόγνωση και τέλος να ανιχνεύσουμε ανοσοιστοχημικά την παρουσία των πρωτεϊνών HSP 70 και p53 στα καρκινικά κύτταρα και να ελέγξουμε πιθανή σχέση τους με την πρόγνωση του όγκου.

Η κατανομή του όγκου στη σειρά των ασθενών μας όσον αφορούσε το φύλο, ήταν παρόμοια με αυτήν των περισσότερων δημοσιευμένων μελετών, με ελαφρά υπεροχή του αντρικού έναντι του γυναικείου φύλου [24], ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά συχνότητας μεταξύ πρώτης και δεύτερης δεκαετίας τη ζωής [21]. Συχνότερη στους ασθενείς μας ήταν η εντόπιση του όγκου στη λεκάνη παρά στο μηριαίο, ενώ σημαντική ήταν και η συμμετοχή του θωρακικού τοιχώματος. Το χρονικό διάστημα των 3 μηνών καθυστέρησης στη διάγνωση από τη στιγμή εμφάνισης των συμπτωμάτων θεωρήθηκε ασφαλές, ενώ δεν έλειψαν και οι περιπτώσεις λανθασμένης θεραπείας για οστεομυελίτιδα. Ηλικία μικρότερη των δέκα ετών δεν φάνηκε να επηρεάζει την πρόγνωση όπως σε άλλες μελέτες [109], αλλά οι δικοί μας ασθενείς προερχόμενοι αποκλειστικά από νοσοκομείο Παιδών δεν ξεπερνούσαν το δέκατο-πέμπτο έτος της ηλικίας, εκτός από έναν. Ανεξάρτητο επίσης της συνολικής πρόγνωσης ήταν και το φύλο, επιβεβαιώνοντας την αντίφαση πολλών ερευνών [310].

Εργαστηριακοί δείκτες όπως η Αναιμία, ΤΚΕ, και Λευκοκυττάρωση δεν βρέθηκε να σχετίζονται με την πρόγνωση όπως έχει αναφερθεί από άλλους, ενώ η αυξημένη γαλακτική δευδρογενάση θεωρήθηκε οριακός αρνητικός προγνωστικός δείκτης [105,117].

Ο όγκος της κακοήθους εξεργασίας δεν είχε υπολογιστεί στους ασθενείς μας, ούτε με προεγχειρητική αξονική ή μαγνητική τομογραφία με τη μέθοδο που εισήγαγαν ο Gobel και συν. [311], ούτε αναφέρθηκε με σαφήνεια μετά την εξαίρεση του σαρκώματος. Η μέγιστη όμως διάμετρος του όγκου προσδιορίστηκε σε όλους τους ασθενείς με εξαιρέσιμη ή μη βλάβη και βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με την πρόγνωση όταν είναι μεγαλύτερη από 8cm, όπως έχει υποστηριχθεί και από άλλους ερευνητές [155].

Σημαντικός αριθμός ασθενών (33%) παρουσίαζε μεταστατική νόσο κατά τη διάγνωση και επιβεβαιώθηκε και από εμάς ότι το γεγονός αυτό είναι σημαντικός αρνητικός προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση ελευθέρας νόσου καθώς και για τη συνολική επιβίωση [105,312]. Υποτροπή της νόσου εμφάνισε το 53,3% των ασθενών μας και η πρόγνωση γι αυτούς ήταν δυσμενής ($p=0.001$). Η περιοχική κατανομή του υποτροπιάζοντος σαρκώματος σε σχέση με την πρόγνωση δεν αναλύθηκε, αλλά αριθμός μελετών αναφέρει πως η πρόγνωση είναι χειρότερη για τους ασθενείς εκείνους που εμφανίζουν συνδυασμό τοπικής και απομακρυσμένης υποτροπής, παρά για εκείνους που παρουσιάζουν μεμονωμένα τοπική ή απομακρυσμένη επανεμφάνιση της κακοήθους εξεργασίας [313]. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι και οι τρεις ασθενείς μας που υποτροπίασαν σε διάστημα μεγαλύτερο των 2 ετών (3-7 έτη) από το πέρας της θεραπείας τους κατά την πρώτη εμφάνιση του σαρκώματος Ewing ζουν ακόμη, ενώ μόνο 2 από τους 13 ασθενείς που εμφάνισαν υποτροπή πριν των δύο ετών, επιβίωσαν. Το χρονικό διάστημα επομένως υποτροπής της νόσου είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση [313].

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ όπως αναφέρθηκε, είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένες, απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία πρωτεΐνες, που επιτελούν ποικιλία ενδοκυτταρικών οχηματογωγικών λειτουργιών. Απαντούν είτε σε αυτούσια ενεργή μορφή είτε ενεργοποιούνται επαγωγικά υπό συνθήκες κυτταρικού στρες και παίρνουν το όνομά τους ανάλογα με το μοριακό βάρος τους. Κάτω από την επίδραση βλαβερών για το κύτταρο καταστάσεων, αυξάνονται σε συγκέντρωση προκειμένου να το προστατέψουν, κυρίως αναστέλλοντας τη συνάθροιση αλλοιωμένων πρωτεϊνών και την περαιτέρω αποδόμηση των φυσιολογικών [314]. Εκτός από αυτές τις βασικές λειτουργίες, σειρά από έρευνες έχουν δείξει ότι οι HSPs συμμετέχουν ενεργά και σε ανοσολογικές αντιδράσεις του οργανισμού όπως η αυτοανοσία, η ανοσία των όγκων και επίσης στην αντίσταση κατά των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων [315,316]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 είναι οι πιο άμεσα σχετιζόμενες με την ογκογένεση και την συμπεριφορά των όγκων και αποτελούν σήμερα αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 72 Kd (HSP72), αποτελεί την επαγωγίμη από το στρες μορφή των πρωτεϊνών της οικογενείας αυτής.

Μεγάλος αριθμός ερευνών έχει ασχοληθεί με την ανίχνευση της πρωτεΐνης HSP72 στα καρκινικά κύτταρα διαφόρων επιθηλιακών κακοηθών εξεργασιών, όπως ο καρκίνος του μαστού, της ουροδόχου κύστης, των πνευμόνων, του ήπατος, του παχέως εντέρου κτλ, καθώς και στα κύτταρα όγκων του μεσεγχύματος όπως το οστεοσάρκωμα, και τη σχέση της έκφρασής της με τη συμπεριφορά και την πρόγνωση των όγκων αυτών [317,318,319,320,321,309]. Ο αριθμός ανάλογων μελετών για το σάρκωμα Ewing είναι πολύ περιορισμένος [322].

Μέσα σε ένα καρκινικό κυτταρικό πληθυσμό, τα καρκινικά κύτταρα εκτίθενται σε ποικιλία στρεσογόνων καταστάσεων (πχ. ανεπαρκή παροχή αίματος που προκαλεί ανοξία και αλλαγές στο ενδοκυτταρικό PH), που μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετική σύνθεση και έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 72. Η υπέρ-έκφραση επομένως της πρωτεΐνης αυτής στα πλέον αδιαφοροποίητα κύτταρα ενός όγκου, μπορεί να σημαίνει

αυξημένο βιολογικό στρες που υπόκεινται αυτά, λόγω του ταχύτατου πολλαπλασιασμού τους που δεν αφήνει περιθώρια για επαρκή αιμάτωση και οξυγόνωσή τους. Η ανοσοιστοχημική επομένως ανίχνευση των HSP 70, μπορεί να αποτελεί ένα αρνητικό προγνωστικό δείκτη για την κλινική συμπεριφορά μιας κακοήθειας [317], και έχει υποστηριχθεί από ερευνητές ότι η αυξημένη τους έκφραση σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, μπορεί ίσως να προβλέψει την πιθανότητα υποτροπής της νόσου [323]. Ακόμη έχει υποστηριχθεί ότι οι HSP 70 συμμετέχουν στη μεταφορά πρωτεϊνικών προϊόντων των όγκο- και αντιογκογονιδίων, όπως της p53 [324], και επομένως η αυξημένη τους έκφραση μπορεί να αντανakλά μοριακούς μηχανισμούς μεταμόρφωσης ή ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, με αντίκτυπο πάντα τη χειρότερη κλινική συμπεριφορά του όγκου.

Στον καρκίνο του παχέως εντέρου, έρευνες απέδειξαν ότι η ανοσοιστοχημική ανίχνευση αυξημένης έκφρασης των HSP 70 στα καρκινικά κύτταρα, είχε σημαντική συσχέτιση με χαμηλή διαφοροποίηση, επιθετικότερη συμπεριφορά του όγκου, πιο προχωρημένα στάδια της νόσου και χειρότερη πρόγνωση όσον αφορούσε τη συνολική επιβίωση [321].

Το γεγονός ότι οι HSP 70 ασκούν κυτταροπροστατευτική δράση παρεμποδίζοντας την εξέλιξη των μηχανισμών που θα οδηγούσαν σε κυτταρικό θάνατο, οδηγεί στην υπόθεση ότι τα καρκινικά κύτταρα που θα εκτεθούν σε μη θανατηφόρο υπερθερμία θα αναπτύξουν μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών [325]. Επομένως τα κύτταρα αυτά μπορεί να εμφανίσουν αυξημένη βιολογική ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία [326].

Σε μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη που δημοσιεύτηκε το 1998, ο Trieb και συν. μελέτησαν ανοσοιστοχημικά την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 (HSP 72) στα καρκινικά κύτταρα 79 ασθενών με οστεοσάρκωμα, προ της έναρξης Neoadjuvant χημειοθεραπείας, και συσχέτισαν την έκφραση αυτή με την απάντηση στην ακόλουθη χημειοθεραπεία που αυτοί οι ασθενείς έλαβαν [309]. Ακόμη συνέκριναν την έκφραση των πρωτεϊνών μεταξύ των κυττάρων του οστεοσαρκώματος και κυττάρων μη κακοηθών εξεργασιών και ανέφεραν σημαντική υπεροχή της παρουσίας τους στα πρώτα ($p < 0.01$). Παράγοντες όπως το γένος, η ηλικία, η διάρκεια των συμπτωμάτων κτλ. δεν βρέθηκε να σχετίζονται με την έκφραση, ενώ το μέγεθος του όγκου κατά τη διάγνωση ήταν μεγαλύτερο στους ασθενείς που ήταν θετικοί για τις HSP 70 (θετική έκφραση = >15% των κυττάρων εξέφραζαν την πρωτεΐνη). Το 38% των οστεοσαρκωμάτων βρέθηκε να είναι θετικά για την HSP 72, και τα σαρκώματα αυτά παρουσίασαν καλύτερη απάντηση στη μετέπειτα χημειοθεραπεία. Έχει υποστηριχθεί ότι η έκφραση των HSP70 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων έχει ανοσολογική σημαντικότητα, αυξάνοντας την ενδογενή απάντηση του οργανισμού έναντι των κυττάρων του όγκου [327]. Η hsp72 φαίνεται ότι απελευθερώνεται από τα κύτταρα οστεοσαρκώματος που έχουν καταστραφεί από "κύτταρα φυσικούς φονείς" (Natural Killers, NK) [327,328] και στη συνέχεια δεσμεύεται από κύτταρα "παρουσίας αντιγόνου" που την εκθέτουν στην επιφάνεια ανέπαφων ακόμη καρκινικών κυττάρων [329]. Εκεί μπορεί να αναγνωριστεί από τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, πυροδοτώντας μία ανοσολογική απάντηση κατά την οποία τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα και τα B λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται και στρέφονται εναντίον των κυττάρων του όγκου. Όσον αφορά το οστεοσάρκωμα λοιπόν, η έκφραση της HSP 72 φαίνεται να αποτελεί προγνωστικό δείκτη για την απάντηση στη χημειοθεραπεία και μάλιστα έρευνες σε εξέλιξη ελέγχουν την πιθανότητα της ευμενέστερης πρόγνωσης μετά από προκλητή έκφραση της πρωτεΐνης στην επιφάνεια των κυττάρων του οστεοσαρκώματος [309].

Οι ελάχιστες μέχρι σήμερα έρευνες σχετικά με την έκφραση των HSP 70 στα κύτταρα του σαρκώματος Ewing, αποδεικνύουν ότι μετά από την έκθεση σε υπερ-θερμικό μη θανατηφόρο στρες, οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του Ewing αλλά όχι και των φυσιολογικών κυττάρων και επομένως η πιθανότητα ανάπτυξης ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού, μέσω των πρωτεϊνών αυτών, κατά των κυττάρων του όγκου έχει λογική βάση [322,330].

Η ανοσοιστοχημική ανίχνευση των HSP 70 στα δείγματα βιοψίας των δικών μας ασθενών απέβη αρνητική, γεγονός που σημαίνει ότι παρόλο που το σάρκωμα Ewing είναι όγκος υψηλής κακοήθειας με ταχεία ανάπτυξη και ενδεχομένως συνθήκες πλημμελούς αιμάτωσης και οξυγόνωσης δημιουργούν καταστάσεις στρες μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, ωστόσο δεν υπάρχει υπερ-έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 και επομένως δεν είναι δυνατόν αυτές να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη προ της έναρξης της θεραπείας. Δεν μπορούμε όμως να γνωρίζουμε εάν οι HSP 70 δεν εκφράζονται στη συνέχεια κατά την έναρξη της χημειοθεραπείας και αν ακόμη η προκλητή έκφρασή τους με τη χρήση υπερθερμίας (πχ. αυξημένη αιματική ροή του άκρου ή χρήση μικροκυμάτων) ή και ταυτόχρονης ακτινοβολήσης θα μπορούσε να πυροδοτήσει έναν ανοσολογικό κατά του όγκου μηχανισμό, βελτιώνοντας περαιτέρω την πρόγνωση.

Ο έλεγχος της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, ενέχει δύο αλληλοσχετιζόμενες οδούς καταστολής της προώθησης του όγκου: η μία ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S, και η άλλη πυροδοτεί την απόπτωση ως απάντηση στην κυτταρική βλάβη [331]. Η έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA όπως η ακτινοβολία και οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες οδηγεί στην ενεργοποίηση και τη σταθεροποίηση του "άγριου/φυσιολογικού" τύπου της p53 [273]. Η δράση της p53 αφορά πρωταρχικά αναστολή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (G1 checkpoint) που επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του waf 1 αναστολέα της κινάσης της κυκλίνης (waf : wild-type p53-activated fragment) [332], ενώ φαίνεται να συμμετέχει ανασταλτικά και στη G2/M φάση (G2/M checkpoint) του κυτταρικού κύκλου [279], οδηγώντας σε απόπτωση των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη. Όταν όμως η πρωτεΐνη χάσει τη φυσιολογική λειτουργία της λόγω μεταλλάξεων ή απωλειών τμημάτων των χρωμοσωμάτων, τότε τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν αποπίπτουν μετά από καταστροφή του DNA, με συνέπεια δύο καταστρεπτικά αποτελέσματα : αντίσταση στην αντινεοπλασματική θεραπεία και άθροιση περαιτέρω μεταλλάξεων [333].

Σε μια έρευνα 38 περιπτώσεων σαρκώματος Ewing, ο Mangham και συν. [334], ανέφερε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p53 σε ποσοστό άνω του 10% των καρκινικών κυττάρων τριών από ασθενείς, είχε στατιστική συσχέτιση με βραχύτερη επιβίωση ελευθέρως νόσου καθώς και συνολική επιβίωση. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη ο Abudu και συν. [292], μελετώντας 52 περιπτώσεις ανέφερε επίσης ότι στους 7 ασθενείς που εμφάνισαν υπέρ-έκφραση της p53 (ποσοστό >10% των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων), οι παραπάνω παράμετροι επιβίωσης ήταν επίσης δυσμενείς και μάλιστα ανεξάρτητοι από άλλους παράγοντες πρόγνωσης όπως η ηλικία, η εντόπιση ή το μέγεθος του όγκου.

Στη σειρά των δικών μας 30 ασθενών, δεχθήκαμε την άποψη άλλων ερευνητών ότι η ανίχνευση της p53 σε ποσοστό $\geq$ του 20% των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων του σαρκώματος Ewing αποτελεί πιο ασφαλές όριο για τον καθορισμό μετάλλαξης της πρωτεΐνης [306]. Τρεις από τους ασθενείς μας (10%), εμφάνισαν υπέρ-έκφραση της p53 στα καρκινικά κύτταρα, συμβαδίζοντας με το αναφερόμενο στη βιβλιογραφία ποσοστό

του 8-13% [225,226,306,307,308]. Ο μικρός αριθμός των ασθενών μας που εμφάνιζαν μετάλλαξη της πρωτεΐνης ($n = 3$), μειώνει την αξία των στατιστικών αναλύσεων, παρόλα αυτά όμως η απουσία συσχέτισης της υπέρ-έκφρασης της με την παρουσία σύγχρονων μεταστάσεων κατά τη διάγνωση [306] καθώς και η αρνητική πρόγνωση για την επιβίωση ελευθέρως νόσου και τη συνολική πενταετή επιβίωση, συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών [334,292].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο μικρός αριθμός των ασθενών μειώνει σχετικά την αξιοπιστία των στατιστικών αναλύσεων και ενέχει τον κίνδυνο εξαγωγής διαφορετικών αποτελεσμάτων από αυτά μιας πιο εκτεταμένης σε μέγεθος έρευνας. Ακόμη, ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος της υπέρ-έκφρασης της p53 ως δείκτη μετάλλαξης της πρωτεΐνης, φαίνεται επαρκής και αξιόπιστος αλλά δεν αποτελεί την τέλεια μέθοδο. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της P53 σε αποθηκευμένο σε μπλοκ παραφίνης υλικό, αποτελεί εύκολη μέθοδο και σε συνδυασμό με αποδεδειγμένες για τη μετάλλαξή της τεχνικές, θα μπορούσε να υποδείξει μια κατηγορία ασθενών με καθορισμένα φτωχότερη πρόγνωση που θα μπορούσαν να αντιμετωπισθούν με πιο έντονη πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία, περιλαμβάνοντας παράγοντες με αποδεδειγμένη μικρότερη επιδεκτικότητα στην σχετιζόμενη με την p53 χημειο-ανθεκτικότητα [335,336,337].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αφορά την αναδρομική μελέτη 30 ασθενών που νοσηλεύθηκαν στο Νοσοκομείο Παιδών των Αθηνών « Η Αγία Σοφία » κατά το χρονικό διάστημα από το 1985 έως και το 2000, με τη διάγνωση σαρκώματος Ewing των οστών. Η Διδακτορική Διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη των επιδημιολογικών χαρακτήρων του σαρκώματος Ewing στη χώρα μας, στην ανάλυση κλινικών και εργαστηριακών προγνωστικών παραγόντων και στη συσχέτιση της παρουσίας μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, όπως οι HSP 70 και p53 στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων, με την πρόγνωση του όγκου. Παρόμοια μελέτη επιδημιολογικού χαρακτήρα στη χώρα μας δεν έχει επαναληφθεί, καθώς επίσης και ανάλυση κλινικο-εργαστηριακών προγνωστικών παραγόντων τουλάχιστον σ' αυτό τον αριθμό ασθενών. Οι μελέτες της παρουσίας μεταλλαγμένων πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 (HSP 70) καθώς και της p53 στα σαρκώματα Ewing και η σχέση τους με την πρόγνωση της νόσου, στη Διεθνή βιβλιογραφία, είναι ιδιαίτερα περιορισμένες σε αριθμό.

Η αναλογία αγοριών / κοριτσιών στους ασθενείς μας ήταν 1.8 : 1 ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά συχνότητας εμφάνισης του όγκου μεταξύ πρώτης και δεύτερης δεκαετίας τη ζωής. Η εντόπιση του όγκου στον αξονικό και τον περιφερικό σκελετό ήταν ισότιμη, και τα περισσότερα περιστατικά (30%) αφορούσαν την πύελο. Περιοχές όπως η Λαμία και το Αγρίνιο εμφάνισαν σημαντική συχνότητα προέλευσης των ασθενών, όμως δεν υπήρξαν επαρκή στοιχεία ώστε να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα που θα αφορούσαν την καταγωγή των αρρώστων. Ομοίως η παρατήρηση ότι το 17% των συγγενών Α' ή Β' βαθμού εμφάνιζε ιστορικό κακοήθειας, καθώς και το ότι σημαντικό ποσοστό των μητέρων των ασθενών είχαν ιστορικό μιας τουλάχιστον αποβολής και ελάμβαναν ή είχαν λάβει ορμονοθεραπεία, δεν μπορεί να στηριχθεί στατιστικά λόγω ανεπάρκειας στοιχείων σε εθνικό επίπεδο για τον επιπολασμό των παραπάνω οντοτήτων. Δέκα από τους ασθενείς (33%) εμφάνιζαν μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης και 16 (53 %) εμφάνισαν υποτροπή της νόσου. Δέκα επτά ασθενείς (56.6%) τελικά απεβίωσαν. Δύο (6.7%) από τους ασθενείς αντιμετωπίστηκαν αρχικά με τη διάγνωση οστεομυελίτιδας, γεγονός που καθυστέρησε την αντιμετώπισή τους πέραν των τριών μηνών. Ποσοστό 83% από τους ασθενείς με εντόπιση του όγκου στο θωρακικό τοίχωμα εμφάνισαν εμπύρετο και ποσοστό 77.7% από τους ασθενείς με εντόπιση στην πύελο είχαν υψηλή Γαλακτική Δευδρογενάση (LDH) στον ορό.

Η εντόπιση του όγκου κεντρικά (πύελος και θωρακικό τοίχωμα), βρέθηκε να έχει στατιστική συσχέτιση με την 5-ετή επιβίωση των ασθενών ($p=0.028$), καθώς και με την εμφάνιση υποτροπής του όγκου ($p=0.025$). Η ηλικία των ασθενών (έως και δέκα ετών / άνω των δέκα ετών), καθώς και η καθυστέρηση της διάγνωσης και της αρχικής αντιμετώπισης άνω των 3 μηνών, δεν βρέθηκε να επηρεάζει την πρόγνωση όσον αφορούσε την 5-ετή επιβίωση ($p=0.269$ και $p=0.338$, αντίστοιχα). Ανεξάρτητο της επιβίωσης ήταν επίσης και το φύλλο των ασθενών. Η παρουσία αναιμίας επίσης δεν βρέθηκε να επηρεάζει την πρόγνωση, $p=0.523$, ενώ η αυξημένη LDH του ορού είχε οριακή στατιστική συσχέτιση με την 5-ετή επιβίωση, $p=0.062$.

Η παρουσία σύγχρονων μεταστάσεων κατά τη διάγνωση, καθώς και η υποτροπή του όγκου, επηρέαζαν σημαντικά την πρόγνωση για 5-τη επιβίωση των ασθενών (p values, 0.002 και 0.001 αντίστοιχα). Η παρουσία των αρχικών μεταστάσεων είχε συσχέτιση και με τη συχνότητα εμφάνισης των υποτροπών της νόσου ($p=0.002$). Ο χρόνος εμφάνισης των μεταστάσεων κατά την υποτροπή της νόσου, βρέθηκε επίσης να έχει συσχέτιση με την πρόγνωση, με τους ασθενείς που εμφάνιζαν υποτροπή μετά τα δύο χρόνια από το πέρας της αρχικής θεραπείας, να παρουσιάζουν 3-ετή επιβίωση σε σαφώς μεγαλύτερο ποσοστό ($p=0.001$). Η μέγιστη διάμετρος του όγκου πέραν των 8cm, είχε σχέση με τη συνολική επιβίωση ($p=0.05$), και με την εμφάνιση υποτροπής της νόσου ($p=0.043$), αλλά όχι με την παρουσία αρχικών μεταστάσεων.

Η ανοσοιστοχημική ανίχνευση των HSP 70 στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων του σαρκώματος Ewing απέβει αρνητική, αποκλείοντας έτσι τη συμμετοχή των πρωτεϊνών αυτών στην πρόγνωση του όγκου. Η έκφραση (+) ή όχι (-) της p53, δεν βρέθηκε να επηρεάζει την 5-τη πρόγνωση ($p=0.532$) αλλά η υπερ-έκφρασή της (σε ποσοστό άνω του 20% των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων, γεγονός που υποδήλωνε μετάλλαξη, επηρέαζε την πρόγνωση των ασθενών αυτών ($p=0.039$). Σημαντική ήταν επίσης η συσχέτιση της υπερ- έκφρασης της πρωτεΐνης με την εμφάνιση υποτροπής της νόσου ($p=0.006$), ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ύπαρξη αρχικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση ($p=0.078$).

Ο αγώνας για την εύρεση της « Αχιλλείου πτέρνας » του δεύτερου σε συχνότητα πρωτοπαθούς αυτού όγκου της παιδικής ηλικίας, συνεχίζεται. Σήμερα είναι γενικώς παραδεκτό ότι η προεγχειρητική χημειοθεραπεία (Neo-adjuvant Chemotherapy), σε συγκεκριμένες περιπτώσεις έντονη και πολυπαραγοντική, καθώς και η χειρουργική εξαίρεση του όγκου οποτεδήποτε ο χειρουργός είναι ικανός να τον αφαιρέσει, και η συνέχιση της χημειοθεραπείας για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, είναι η καλύτερη μέθοδος αντιμετώπισης του σαρκώματος Ewing. Η αναγνώριση των προγνωστικών εκείνων παραγόντων που ενδεχομένως θα καθορίσουν την πορεία της νόσου έχει ιδιαίτερη σημαντικότητα, διότι υποδεικνύει τους ασθενείς εκείνους στους οποίους θα ήταν θεμιτή η εφαρμογή των σύγχρονων έντονων πολυπαραγοντικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων, χωρίς να υποβάλλει όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς στις παρενέργειες της χημειοθεραπείας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή και σκοπός:

Το σάρκωμα Ewing αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό πρωτοπαθή όγκο της παιδικής ηλικίας και η 5-ετής επιβίωσή του μόλις ξεπερνά το 70%. Σήμερα είναι γενικά παραδεκτό ότι η προεγχειρητική χημειοθεραπεία και η ευρεία χειρουργική εξαίρεση όποτε είναι δυνατή, ακολουθούμενη από παρατεταμένη χημειοθεραπεία, είναι η καλύτερη μέθοδος αντιμετώπισής του. Σκοπός αυτής της μελέτης υπήρξε η επιδημιολογική ανάλυση των χαρακτήρων της νόσου στην κεντρική και νότια Ελλάδα και η αναγνώριση κλινικών και εργαστηριακών προγνωστικών παραγόντων. Επίσης, η ανίχνευση της πιθανής υπερέκφρασης των Πρωτεϊνών Θερμικού Σοκ 70 και της p53 στους καρκινικούς πυρήνες και η συσχέτισή τους με την πρόγνωση του όγκου.

Ασθενείς και μέθοδος:

Τριάντα ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν για σάρκωμα Ewing των οστών σε μια χρονική περίοδο 15 ετών, σε ένα νοσοκομείο παιδών της χώρας μας, περιελήφθησαν στη μελέτη. Τα πρωτόκολλα θεραπείας δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά σ' αυτή τη χρονική περίοδο. Τα αγόρια προσβάλλονταν συχνότερα από τα κορίτσια (αναλογία 1.8 :1). Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 10.5 έτη (εύρος 2-18 έτη). Η συμμετοχή του κεντρικού και του περιφερικού άξονα ήταν ισότιμη. Μια σειρά από κλινικούς και εργαστηριακούς δελικτες ελέγχθηκαν για πιθανή συσχέτισή τους με την Ελευθέρας Συμπτωμάτων και Συνολική Επιβίωση. Έκφραση της p53 και των HSP 70 σε ποσοστό άνω του 20% και 15% των καρκινικών πυρήνων αντίστοιχα, θεωρήθηκε συμβατή με μετάλλαξη των παραπάνω πρωτεϊνών και συσχετίστηκε επίσης με την Ελευθέρας Συμπτωμάτων και Συνολική Επιβίωση. Ο μέσος χρόνος επανεξέτασης ήταν 7.2 έτη.

Αποτελέσματα:

Δεκαεπτά ασθενείς απεβίωσαν. Μεταστάσεις κατά την αρχική διάγνωση εμφανίστηκαν σε 10 ασθενείς (33%) και είχαν σημαντική αρνητική πρόγνωση ($p=0.002$). Η εντόπιση του όγκου στον κεντρικό άξονα βρέθηκε επίσης να είναι αρνητικός παράγοντας για την πρόγνωση, καθώς και η διάμετρος του όγκου πέραν των 8 εκατοστών ($p=0.05$). Η υποτροπή του όγκου και μάλιστα νωρίτερα των δύο ετών, ήταν επίσης ένας σημαντικός αρνητικός παράγοντας. Αυξημένη γαλακτική δευδρογενάση στον ορό ήταν οριακά σημαντική για την πρόγνωση ($p=0.062$). Η ανίχνευση των HSP 70 στους καρκινικούς πυρήνες απέβει αρνητική γεγονός που αποκλείει, τουλάχιστον κατά τη φάση της βιοψίας, την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών και τη συμμετοχή τους στην πρόγνωση της νόσου. Μεταλλαγμένη p53 ανιχνεύθηκε στο 13% των καρκινικών πυρήνων και βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με 5-ετή συνολική επιβίωση ($p=0.039$) καθώς και με Ελευθέρα συμπτωμάτων επιβίωση ($p=0.006$).

Συζήτηση:

Η θεραπεία του σαρκώματος Ewing είναι απαιτητική και δεν στερείται επιπλοκών. Η αναγνώριση των ασθενών που αναμένεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση, θα υποδείκνυε τους ασθενείς εκείνους στους οποίους θα ήταν θεμιτή η εφαρμογή των σύγχρονων έντονων πολυπαραγοντικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων, χωρίς να υποβάλλει όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς στις παρενέργειες της θεραπείας.

ABSTRACT

Introduction and Aim:

Ewing's sarcoma is the second commonest primary tumor in childhood and its 5-year survival is currently just over 70%. The current consensus regarding its management includes Neo-adjuvant chemotherapy and wide surgical excision whenever possible followed by prolonged intense chemotherapy. Aim of this study was to look into the Epidemiology of the disease in Central and Southern Greece and identify clinical and laboratory prognostic factors. Furthermore, our objective included the study of the prognostic significance of p53 and hsp70 overexpression into the nuclei of tumor cells.

Patients and methods:

Thirty patients who had been treated for Ewing's sarcoma of bone within a 15-year period, in a single Children's hospital, were included in the study. Treatment protocols did not considerably change in time. Boys were more commonly affected (ratio 1.8: 1). The average age was 10.5 years (range 2-18y). Central axis and extremities were equally affected. A wide spectrum of clinical and laboratory factors were correlated to Event Free Survival and Total Survival of the disease. Expression of P53 and HSP70 in >20% and >15% of the tumor nuclei respectively, was considered compatible with mutation. This overexpression of the above proteins was also correlated with the EFS and TS. The mean follow up was 7.2 years.

Results:

Seventeen patients eventually died. Initial metastases were present in 33% of patients and were strongly associated with a bad prognosis ($p=0.002$). Central tumor location was also a negative factor, as well as tumor diameter over 8cm ($p=0.05$). Tumor recurrence, and especially when earlier than 2 years, was also associated with bad prognosis. Raised LDH was marginally significant ($p=0.062$). HSP70 trace was negative, meaning that at the time of biopsy the tumor nuclei were not expressing the protein. Mutated p53 was traced in 13% of the tumor nuclei and had significant negative prognostic value in 5-year survival ($p=0.039$) and in Event Free Survival ($p=0.006$).

Discussion:

Treatment of Ewing's sarcoma is intense and doesn't lack complications. The search of factors that could independently affect the prognosis of the disease continues. Identification of those patients likely to have a poorer prognosis would guide our treatment plans without putting all patients in the risk of adverse effects.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Εισαγωγή

1. Ewing J: Diffuse endothelioma of bone. Proc. NY Pathol. Soc 21:17-24,1921.
2. Bacci G, Toni A, Avella M, et al: Long term results in 144 localised Ewing's sarcoma patients treated with combined therapy. Cancer 63:1477-1486,1989.
3. Boyer C, Brickner T, Perry R: Ewing's sarcoma. Case against surgery. Cancer 20: 1602-1606, 1967.
4. Johnsons R, Humphreys SR: Past failure and future possibilities in Ewing's sarcoma. Experimental and preliminary results. Cancer 23:161-166,1969.
5. Fernandez CH, Lindberg RD, et al.: Localised Ewing's sarcoma-treatment and results. Cancer 34:143-148,1974.
6. Rosen G, et al. Disease-free survival in children with Ewing's sarcoma treated with radiation therapy and adjuvant four-drug sequential chemotherapy. Cancer 33: 384-393,1974.
7. Nesbit ME et al.: Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone. An Intergroup study. Natl Cancer Inst Monogr 56:255-262,1981.
8. Nesbit ME et al.: Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone: A long-term follow-up of the first Intergroup study. J Clin Oncol 8:1664-1674,1990.
9. Burgert EO jr, Nesbit EM, Camsey LA, et al.: Multimodal therapy for the management of nonpelvic localised Ewing's sarcoma of bone: Intergroup study IEES-II. J Clin Oncol 8: 1517-1524,1990.
10. Lewis RJ, Marcove RC, Rosen G.: Ewing's sarcoma-functional effects of radiation therapy. J Bone Joint Surg 59A:325-333,1977.
11. O'Connor MI, Pritchard DJ.: Ewing's sarcoma. Prognostic factors, disease control, and the reemerging of surgical treatment. Clin Orthop 262:78-87,1991.
12. Grier H,Krailo M, Tarbel N,et al.: Adding ifosfamide and etoposide to vincristine, Cyclophosphamide, adriamycine and actinomycin improves outcome in non-metastatic Ewing's sarcoma and PNET: update CCG/POG study [letter]. Med Pediatr Oncol 1996, 27:259.
13. Bacci G, Ferrari S, et al: Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli. J Clin Oncol 2000, 18:4-11.
14. Atra A, et al.: High- dose Busulphan/Melphalan with autologous stem cell rescue in Ewing's sarcoma. Bone Marrow Transplant 1997, 20:843-846.
15. Lucidarme N, et al.: Phase II study of high-dose Thiotepa and hematopoietic stem cell transplantation in children with solid tumours. Bone Marrow Transplant 1998, 22:535-540.
16. Kovar H, et al.: The Ewing family of tumors and the search for the Achilles' heel. Current Opin Oncol 1999, 11:275-284.

Ορισμός

17. May WA, Gishizski ML, et al.: Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that require the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. Proc Nat Acad Sci USA 1993, 90;5852-5856.

Επιδημιολογία

18. Pritchard Dij., et al. Ewing's sarcoma. A clinicopathological and statistical analysis of patients surviving 5 years or longer. J Bone Joint Surg 57A:10-16,1975.
19. Larson S, Boquist L, Bergdahl L: Ewing's sarcoma-a consecutive series of 64 cases diagnosed in Sweden. Clin Orthop Rel Res 95:263-272, 1973.
20. Misser JS, Kinsella TJ: Ewing's sarcoma and the differentiated sarcomas, in Pizzi PA, Poplack DG (eds): Principles and Practices of Pediatric Oncology, Chapter 31. Philadelphia, JB Lippincott Company, 1989.
21. Dahlin DC, Unni KK: Bone Tumours. General aspects and data on 8542 cases, ed 4. Springfield IL, Charles C Thomas, 1986,pp 269-305.
22. Kissane JM, Askin FB et al.: Ewing's sarcoma of bone: Clinicopathologic aspects of 303 cases from the Intergroup Ewing's sarcoma study. Hum Pathology 14:773-779, 1983.
23. Li FB, Tu J, Liu F, et al.: Rarity of Ewing's sarcoma in China. Lancet 1:1255, 1980.
24. Joyce M, Harmon D, Mankin H, et al.: Ewing's sarcoma in female siblings: a clinical report and review of the literature. Cancer 53:159, 1984.
25. Mirra JM, Picci P: Ewing sarcoma, in Bone Tumours: Clinical Radiologic and Pathologic Correlations, Vol 2. Philadelphia, Lea and Febiger,1989, pp1087-1117.
26. Eggli KD, Quiogue T, Moser R : Ewing's sarcoma. Radiol Clin North Am 1993,March; 31(2):325-337.

Κύτταρο καταγωγής- Οικογένεια όγκων Ewing

27. Llombart-Bosch A, Lacombe MJ, Contesso G, et al.: Small round blue cell sarcoma of bone mimicking atypical Ewing's sarcoma with neuroectodermal features: An analysis of five cases with immunohistochemical and electron microscopic support. Cancer 60:1570-1582,1987.
28. Mckeen C, Thile CJ, Ross RA, et al.: Indistinguishable patterns of protooncogene expression in two distinct but closely related tumours: Ewing's sarcoma and neuroepithelioma. Cancer Res 48: 4307-4311, 1988.
29. Cavazzana AO, et al.: Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. Am J Pathol 127:507-518,1987.
30. West DC: Ewing sarcoma family of tumours. Current opinion in Oncology 2000,12:323-329.

31. Delattre O, Zucmann J, Plougastel B, et al.: Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours, *Nature* 359:162-165,1992.
32. Ladanyi M, Gerald W.: Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumour, *Cancer Res* 54:2837-2840,1994.
33. Lopez-Terrada D: Molecular genetics of small round cell tumours, *Semin Diagn Pathol* 13: 242-249, 1996.
34. Ladanyi M: The emerging molecular genetics of sarcoma translocation, *Diagn Mol Pathol* 4: 162-173,1995.
35. Dunn T, Praissman L, et al: ERG gene is translocated in an Ewing's sarcoma cell line, *Cancer Genet Cytogenet* 76: 19-22, 1994.
36. Aurias A, Rimbaut C, et al: Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma: a cytogenetic study of four fresh tumours, *Cancer Genet Cytogenet* 12: 21-25,1984.
37. Douglass EC: Chromosomal rearrangements in Ewing's sarcoma and peripheral Neuroectodermal tumour (PNET), *Semin Devel Biol* 1:393-396,1990.
38. Bhagirath T, Abe S, Nojima T, Yoshida MC: Molecular analysis in a t (11; 22) translocation junction in a case of Ewing's sarcoma, *Genes Chromosomes Cancer* 13:126-132,1995.
39. Zucman J, et al: Combinational generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours, *EMBO J* 12: 4481-4487, 1993.
40. Plougastel B, Zucman J et al: Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumour-associated chromosome translocation, *Genomics* 18: 609-615, 1993.
41. Zucman J, Delattre O et al: Cloning and characterization of the Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma t (11; 22) translocation breakpoints. *Genes Chromosomes Cancer* 1992, 5: 271-277.
42. De Alava E, Gerald W: Molecular Biology of the Ewing's sarcoma /Primitive Neuroectodermal Tumour family, *J of Clin Oncology*, 18(1): 204-213,2000.
43. Sorensen PH, Lesnick SL et al: A second Ewing's sarcoma translocation, t (21; 22), fuses the EWS gene to another ETS family transcription factor, ERG, *Nat Genet* 6:146-151,1994.
44. Jeon I-S, Davis JN, et al: A variant Ewing's sarcoma translocation (7; 22) fuses the EWS gene to the ETS gene, ETV-1, *Oncogene* 10:1229-1234,1995.
45. Urano F, Umezawa A, Hong W et al: A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 608-612, 1996
46. Peter M, Coutyrier J, et al: A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumours. *Oncogene* 14:1159-1164, 1997.
47. Ohno T, Rao VN, and Reddy ESP: EWS-FLI1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res* 53:5859-5863, 1994.
48. May WA, Arvand A, Thompson AD, et al: EWS-FLI1-induced manic fringe renders NIH3T3 cells tumorigenic. *Nat Genet* 17:495-497,1997.
49. Arvand A, Bastians H, et al: EWS-FLI1 up regulates m E2-C, a cyclin-selective ubiquity conjugating enzyme involved in cyclin B destruction. *Oncogene* 17:2039-2045,1998.

50. Magnaghi-Jaulin L, Masutani H, et al: SRE elements are binding sites for the fusion protein EWS-FLI1. *Nucleic Acids Res* 24; 1052-1058,1996.
51. Watson DK, Robinson L, Hodge DR, et al: FLI1 and EWS-FLI1 function as ternary complex factors and ELK1 and SAP1a function as ternary and quaternary complex factors on the *egr1* promoter serum response elements. *Oncogene* 14;213-221,1997.
52. Toretsky JA, Kalebic T, et al: The insulin-like growth factor 1 receptor is required for EWS/FLI1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 272;30822-30827,1997.
53. Toretsky JA, Conell Y, et al: Inhibition of EWS/FLI1 fusion protein by antisense oligodeoxynucleotides. *J Neuroonc* 31; 9-16,1997
54. Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, et al: Inhibition of apoptosis by normal and aberrant FLI1 and *erg* proteins involved in human solid tumours and leukemias. *Oncogene* 14;1259-1268,1997.

Κλινική εικόνα

55. Wilkins RM, Pritchard DJ, et al: Ewing's sarcoma of bone. Experience of 140 Patients. *Cancer* 58:2551-2555,1986.
56. Grubb MR, Currier BL, Pritchard DJ et al: Primary Ewing sarcoma of the spine. *Spine* 19;309-313,1994.
57. Glaubiger DL, Macuch RW, Schwartz J: Influence of prognostic factors on survival in Ewing's sarcoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 56:285-288,1981.

Ακτινολογικά ευρήματα

58. Resnick Donald: Tumours and tumour-like lesions of Bone: Radiographic principles, *In Resnick's Bone and Joint Imaging*, W.B Saunders co.1989, 1096-1192.
59. Shermann RS, Soong KY: Ewing's sarcoma: It's roentgen classification and diagnosis. *Radiology*, 66:529-539, 1956.
60. Swenson PC: The roentgenologic aspects of Ewing's tumour of bone marrow. *AMJ, Am J Rendgenol*, 50: 343-353, 1943
61. Levine E, Levine C: Ewing tumour of rib. Radiologic findings and computed tomography contribution. *Skelet Radiol* 9:227-233, 1983.
62. Estes DN, Magill HL, Thompson EL, et al: Primary Ewing sarcoma: follow-up with Ga-67 scintigraphy. *Radiology* 17:449-453,1990.

Διάγνωση

63. Dickman PS, Triche TJ: Extraosseus Ewing sarcoma versus primitive rbdomyosarcoma: Diagnostic criteria and clinical correlation. *Hum Pathol* 17:881-893, 1986
64. Horowitz ME, Tsokos MG, Thomas FD: Ewing's sarcoma. *CA-A Cancer Journal for clinicians* 42 (5):300-320, 1992

65. Mankin HF, Lange TA, Spanier SS: The hazards of biopsy in patients with malignant primary bone and soft tissue tumours. *J Bone J Surg* 68: 1121-1127, 1982
66. Vlasak Richard and Sim Franklin: Ewing's sarcoma. *Paediatric Orthopaedic Oncology, Orthopaedic Clinics of North America*, 27 (3):591-603, 1996
67. Huvos, Andrew: Bone tumours: Diagnosis Treatment and Prognosis, W.B.Saunders, 1991.
68. Llombart-Bosch A, Contesso G, Peydro-Olaya A: Histology, himmunochemistry and electron microscopy of small round cell tumors of bone, *Semin Diagn Pathol* 13:153-170,1996.
69. Llombart-Bosch A, Peydro-Olaya A: Scanning and transmission electron microscopy of Ewing's sarcoma of bone: typical and atypical variants-an analysis of nine cases, *Virchows Arch [A]* 398: 329-346, 1983.
70. Goodfellow P, et al: Genetic evidence that a Y-linked gene in man is homologous to a gene on X chromosome, *Nature* 302:346-349,1983
71. Gelin C, et al: The E2 antigen, a 32Kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product, *EMBO J* 8:3253-3259,1989.
72. Levy R, Dilley J, Fox RI, Warnke R: A human thymus leukaemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies, *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6552-6556,1979.
73. Fellingner EJ, Garin Chesa P, Triche TJ, Huvos AG: Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32^{MIC2}, *Am J Pathol* 139:317-325,1991.
74. Hamilton G, Fellingner AJ, Schratter I: Characterization of a human endocrine tissue and tumor associated Ewing's sarcoma antigen, *Cancer Res* 48:6127-6131, 1988.
75. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Saltzer-Kuntchic M: MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and Primitive Neuroectodermal tumours: evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive Neuroectodermal tumours from MIC2 expression and specific chromosome aberrations, *Cancer* 67:1886-1893,1991.
76. Perlmann EJ, Dickman PS, Askin FB, et al: Ewing's sarcoma: routine diagnostic utilization of MIC2 analysis-a Paediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup study, *Hum Pathol* 25:304-307,1994.
77. Riopel M, Dickman PS, Link MP, Perlman EJ: MIC2 analysis in Paediatric lymphomas and leukemias, *Hum Pathol*, 25:396-399,1994.
78. Moll R, Lee I, et al: Immunohistochemical analysis of Ewing's tumours: patterns of intermediate filaments and desmosomal proteins indicate cell type heterogeneity and phenopotentia differentiation, *Am J Pathol* 127:288-304, 1987.
79. Navarro S, Cavazzanna AO, Llombart Bosch A, Triche TJ: Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma: an immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive Neuroectodermal neoplasms, *Arch Pathol Lab Med* 118:608-615,1994.
80. Nogueira E, Navarro S, Pellin A, Llombart Bosch A: Activation of TrK genes in Ewing's sarcoma: TrK receptor expression is linked to neural differentiation, *Diagn Mol Pathol* 6:10-16,1997.
81. Carter RL, al- Sams SZ, Corbet RP, Clinton S: A comparative study of immunohistochemical staining for neuron specific enolase, protein gene product

- 9.5 and S-100 protein in neuroblastoma and other round cell tumours in children, *Histopathology* 16:461-467,1990.
82. Harris MD, Moore IE, Steart PV, Weller O: Protein gene product (PGP) 9.5 as a reliable marker in primitive Neuroectodermal tumours: an immunohistochemical study of 21 childhood cases, *Histopathology* 16:271-277,1991.
 83. Lipinski M, et al: HNK-1 antibody detects an antigen expressed in Neuroectodermal cells, *J Exp Med* 158: 1775-1780,1983.
 84. Pagani A, et al: Neural and mesenchymal differentiations in Ewing's sarcoma cell lines: morphological, immunophenotypic, molecular biological and cytogenetic evidence, *IntJ Cancer* 63:738-743,1995.
 85. Donovan MJ, Hempstead BL, Horvath C: Immunohistochemical localization of TrK receptor protein in paediatric small round blue tumours, *Am J Pathol*, 143:1560-1567,1993.
 86. Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G: Molecular and biochemical characterization of the TrK proto-oncogene, *Mol Cell Biol* 9:24-33,1989.

Διαφορική Διάγνωση

87. Llombart Bosch A, Blache R, Peydro-Olaya A: Round cell sarcomas of bone and their differential diagnosis (with particular emphasis in Ewing's sarcoma and reticulosarcoma): a study of 233 cases with optical and electron microscopic techniques, *Pathol Annu* 17:113-145,1982.
88. Devaney K, Vihn TN, Sweet DE: Small cell osteosarcoma of bone: an immunohistochemical study with differential diagnostic considerations, *Hum Pathol* 24:1211-1225,1993.
89. Meis-Kindblom JM, Steinmann G, Kindblom LG: Differential diagnosis of small round cell tumours, *Semin Diagn Pathol* 13:213-241,1996.
90. Triche TJ, Askin FB: Neuroblastomas and the differential diagnosis of small round blue tumours, *Hum Pathol* 14:569-595,1983.
91. Schmitt D, Machay B, Ayalla AG: Ewing's sarcoma of bone with neuroblastoma-like features, *Ultrastruct Pathol* 3:143-151,1982.
92. Triche TJ, Ross WE: Glycogen containing neuroblastoma with clinical and histological features of Ewing's sarcoma, *Cancer* 41:1425-1432,1978.
93. Ayalla AG, et al: Small cell osteosarcoma: a clinicopathologic study of 27 cases, *Cancer* 64:2162-2173,1989.
94. Martin SE, Dwyer A, Kissane SM, Costa J: Small-cell osteosarcoma, *Cancer* 50:990-996,1982.
95. Papadimitriou JC, Drachenberg CB: Ultrastructural features of the matrix of small cell osteosarcoma, *Hum Pathol* 25:430-431, 1994.
96. Sim FH, Unni KK, Beabout JG, Dahlin DC: Osteosarcoma with small cells simulating Ewing's tumour, *J Bone Joint Surg* 61A:207-215,1979.
97. Bertoni F, Picci P, Campanacci M: Mesenchymal chondrosarcoma of bone and soft tissue, *Cancer* 52:533-541,1983.
98. Nakashima Y, Unni K, Shives TC, Swee RG, Dahlin DC: Mesenchymal chondrosarcoma of bone and soft tissue: a review of 111 cases, *Cancer* 57:2444-2453,1986.
99. Steiner GG, Mirra JM, Bullogh PG: Mesenchymal chondrosarcoma: a study of the ultrastructure, *Cancer* 32:926-939,1973.
100. D'Amore ES, Ninfo V: Soft tissue small round cell tumours: morphological

- parameters, *Semin Diagn Pathol* 13:184-203, 1996.
101. Devaney K, Abbondanjo SL, et al: MIC2 detection in tumours of bone and adjacent soft tissues. *Clin Orthop* 310:176-187,1995.

Πρόγνωση

102. Ahrens S, Jabar S, et al: Prognostic significance of tumour volume in a volume adapted treatment strategy for localized Ewing's sarcoma of bone, *Med Pediatr Oncol* 23:221, P130, 1994.
103. Bacci G, Picci P, Gitelis S, Campanacci M: The treatment of localized Ewing's sarcoma: the experience of the Instituto Orthopedico Rizzoli in 163 cases treated with and without adjuvant chemotherapy, *Cancer* 49:1561-1570,1982.
104. Daugaard S, Kamby C, Sunde LM, Myhre-Jensen O, Schiodt T: Ewing's sarcoma: a retrospective study of histological and immunohistochemical factors and their relation to prognosis, *Virchows Archi [A]* 414:243-251,1989.
105. Glaubiger DL, Makuch R, Schwartz J, Levine AS, Johnson RE: Determination of prognostic factors and their influence on therapeutic results in patients with Ewing's sarcoma, *Cancer* 45:2213-2219,1980.
106. Hartmann KR, Triche TJ, Kinsella TJ, Miser JS: Prognostic value of histopathology in Ewing's sarcoma: long term follow-up of distal extremity primary tumours, *Cancer* 67:163-171,1991.
107. Kinsella TJ, et al: Long-term follow up of Ewing's sarcoma of bone treated with combined modality therapy, *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 20:389-395, 1991.
108. Mamegham H, et al: Ewing's sarcoma: long term follow up in 49 patients treated from 1967 to 1989, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25:431-438,1993.
109. Cangir A, Vieti TJ, et al: Ewing's sarcoma Metastatic at diagnosis: results and comparisons of two Intergroup Ewing's sarcoma studies, *Cancer* 66:8870893,1990.
110. Fizazi K, Dohollou N, et al: Adults with Ewing's sarcoma: a retrospective study of 146 cases, *Eur J Cancer* 31A:250S, 1995.
111. De Stefani E, Carzoglio J, Deneo Pelegrini H, et al: Ewing's sarcoma: value of tumour necrosis as a predictive factor, *Bull Cancer (Paris)* 71:16-21,1984.
112. Hayes FA, et al: Therapy for localized Ewing's sarcoma of bone, *J Clin Oncol* 7:208-213,1989
113. Llombart Bosch A, Blache R, et al: Histopathological predictive factors in Ewing's sarcoma of bone and clinicopathological correlations: a retrospective study of 261 cases, *Virchows Arch [A]* 409:627-640,1986.
114. Zucher JM, Henry Amar M, et al: Intensive systemic chemotherapy in localized Ewing's sarcoma in childhood: a historical trial, *Cancer* 52:415,1983.
115. Dorfman HD, Czerniac B: Bone cancers, *Cancer* 75:203-210,1995.
116. Picci P, et al: Prognostic significance of histopathologic response to chemotherapy in non-metastatic Ewing sarcoma of the extremities, *J Clin Oncol* 11:1763-1769,1993
117. Jurgens H, Exner U, Gadner H, et al: Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone: a 6-year experience of a European cooperative Trial, *Cancer* 61:23-32,1988.

118. Terrier P, Llombart Bosch A, Contesso G: Small round blue cell tumours of bone: prognostic factors correlated to Ewing's sarcoma and Neuroectodermal tumor, *Semin Diagn Pathol* 13:250-257,1996.
119. Oberin O, Zucher JM, Brunat-Mentygni M: Prognostic factors in localized Ewing's sarcoma: a study of the French Society of Paediatric oncology (SFOP), *Med Pediatr Oncol* 23:573,1993.
120. Schodel K, Dickman PS, Krailo M: Histologic response to chemotherapy and prognosis in esseous Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor (ES/PNET), Twentieth International Congress of the International Academy of Pathology, *Int J Pathol*, 2S:443,1995.
121. Hijazi YM, Axiotis CA, Navarro S, Steinberg SM, Horowitz ME, Tsokos M: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in Ewing's sarcoma and peripheral primitive Neuroectodermal tumours before and after chemotherapy, *Am J Clin Pathol* 102:61-67,1994.

Θεραπεία

Χημειοθεραπεία-Έλεγχος της συστηματικής νόσου

122. Phillips RF, Higinbotham NL: The curability of Ewing's endothelioma of bone in children. *J Paediatr* 1967; 70:391-7.
123. Cotteril SL, Ahrens S, et al: Prognostic factors in Ewing's sarcoma of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3108-14
124. Jaffe N et al: Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycine D and cyclophosphamide) and radiation therapy. *Cancer* 1976; 38:1925-30.
125. Pomeroy TC, Johnson RE: Combined modality therapy of Ewing's sarcoma. *Cancer* 1975; 35: 36-47.
126. Cangir A, Morgan SK, et al: Combination chemotherapy with adriamycin (nsc-123127) and dimethyltriazenoimidazole carboxamide (DTIC) (NSC-45388) in children with Metastatic solid tumours. *Med Paediatr Oncol* 1976; 2:183-90
127. Smith MA, Ungelreider RS, et al: Influence of doxorubicine dose intensity on response and outcome for patients with osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1460-70.
128. Bryant BM, Jarman M, Ford HT, et al: Prevention of isophosphamide induced urothelial toxicity with 2-mercaptoethane sulphonate sodium (mesnum) in patients with advanced carcinoma. *Lancet* 1980; II:657-9.
129. Zoubec A, Holzinger B, et al: High- Dose cyclophosphamide, adriamycin and vincristine (HD-CAV) in children with recurrent solid tumour. *Paediatr Pheumatol Oncol* 1994;11:613-23.
130. Kushner BH, et al: Very high-dose short- term chemotherapy for poor risk peripheral primitive Neuroectodermal tumours, including Ewing's sarcoma, in children and young adults. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1796-804.
131. Jurgens H, Ahrens S, et al: European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study (EICESS92): first results (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19:2286.

132. Euro-E.W.I.N.G. Study Committee. EURO-E.W.I.N.G. 99 Study Manual: EUROpean Ewing Initiative of National Groups Ewing Tumor Studies 99 (on-line) Available from URL <http://euro-ewing.uni-muenster.de> [Assessed 2001 Octob 17].
133. Jurgens H, Muschenish M, et al: Activity of high dose etoposide in recurrent Ewing's sarcoma: results of a phase II study [abstract]. Proc Am Soc Clin Oncol 1990; 9:313.
134. Pratt CB, Douglass EC, Etcubanas EL, et al: Ifosfamide in paediatric malignant solid tumours. Cancer Chemother Pharmacol 1989; 24 Suppl 1:S24-7
135. Meyer WH, Kun L, Marina N, et al: Ifosfamide plus etoposide in newly diagnosed ewing's sarcoma of bone. J Clin Oncol 1992; 10:1737-42.
136. Paulussen M, Ahrens S, et al: EICESS92 (European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study): preliminary results [in German] Klin Padiatr 1999; 211:276-83.
137. Wexler LA, DeLaney TF, Tsokos M, et al: Ifosfamide and etoposide plus vincristine, doxorubicine and cyclophosphamide for newly diagnosed ewing's sarcoma family of tumours. Cancer 1996; 78:901-11.
138. Marina NM, Pappo AS, et al: Chemotherapy dose intensification for paediatric patients with ewing's family of tumours and desmoplastic small round-cell tumours: a feasibility study in St Jude Children's Research Hospital. J. Clin Oncol 1999; 17:180-90.
139. Nilbert M, Saeter G, et al: Ewing's sarcoma treatment in Scandinavia 1984-1990: ten -year results of the Scandinavian Sarcoma Group Protocol SSGIV. Acta Oncol 1998; 37:375-8.
140. Fizazi K, Zelek L: Is one cycle every three or four weeks obsolete: A critical review of dose- dense chemotherapy in solid neoplasms. Ann Oncol 2000; 11: 133-49.
141. Burdach S, Jurgens H, Peters C, et al: Myeloablative Radiochemotherapy and haematopoietic stem cell rescue in poor-prognosis Ewing's sarcoma. J Clin Oncol 1993; 11:1482-8.
142. Hawkins D, Barnett T, et al: Busulphan, Melphalan and Thiotepa with or without total marrow irradiation with haematopoietic stem cell rescue for poor-risk Ewing's- sarcoma family Tumours. Med Paediatr Oncol 2000; 34:328-37.
143. Ladenstein R, Hartmann O, et al: A multivariate and matched analysis on high risk Ewing tumor (ET) patients treated by megatherapy (MGT) and stem cell reinfusion (SCR) in Europe [abstract] Proc Am Soc Clin Oncol 1999; 18:2144.
144. Fengelhauer J, Hawkins D, Pendergrass T, et al: Very intensive short term chemotherapy for children and adolescents with Metastatic sarcomas. Med Pediatr Oncol 2000; 34: 29-38.
145. Rosito P, Mancini AF, Rondelli R, et al: Italian Cooperative Study for the treatment of children and young adults with localized Ewing sarcoma of bone: a preliminary report of 6 years of experience. Cancer 1999;86:421-8.
146. Elomaa I, Blomqvist CP, et al: Five -year results in Ewing's sarcoma: The Scandinavian sarcoma group experience with SSGIX protocol. Eur J Cancer 2000; 36:875-80.

Έλεγχος της τοπικής νόσου

- 147. Grier HE,: The Ewing family of tumours. *Paediatr Clin North Am* 1997; 44: 991-1004.
- 148. Sailor SL, Harmon DC, et al: Ewing's sarcoma: surgical resection as a prognostic factor. *Int J Radiol Oncol Biol Phys* 1988;15:43-52.
- 149. Horowitz ME, Neff JR, Kun LE: Ewing's sarcoma. Radiotherapy versus surgery for local control. *Pediatr Clin North Am* 1991;38:365-80.
- 150. Enneking WF, et al: A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop* 153:106,1980.
- 151. Kristy LW, Franklin HS: (Instructional Lecture) Ewing's sarcoma: presentation and management. *J Orthop Sci*, 2001;6:366-371.

Ακτινοθεραπεία

- 152. Donaldson S, Shuster J, Andreozzi C: The Paediatric Oncology Group (POG) experience in Ewing's sarcoma of bone. *Med Pediatr Oncol* 17:283, 1989.
- 153. Chabora BM, Rosen G, et al: Radiotherapy of Ewing's sarcoma: Local control with and without intensive chemotherapy. *Radiology* 120: 667-671, 1976.
- 154. Perez CA, Teft M, et al: Radiation therapy in the multimodal management of Ewing's sarcoma of bone: Report of the Intergroup Ewing's Sarcoma Study. *Natl Cancer Inst Monogr* 56:263-271,1981.
- 155. Arai Y, Kun LE, Brooks MT, et al: Ewing's sarcoma: Local control and patterns of failure following limited-volume radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21: 1501-1508, 1991.
- 156. Vlasak R, Sim FH: Ewing's sarcoma. *Orthop Clin North Am* 1996;27:591-603.
- 157. Tucker MA, D'Angio GJ, Boice JD, et al: Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *N Engl J Med* 317;588-593,1987.
- 158. Goldwein JW: Effect of radiation therapy on skeletal growth in childhood. *Clin Orthop* 1991;262:101-7.
- 159. Blatt J, Olshan A, et al: Second malignancies in very-long-term survivors of childhood cancer. *Am L Med* 93;57,1992.

Χειρουργική θεραπεία

- 160. Duffy GP, Wood MB, et al: Vascularized free fibular transfer combined with autografting for the management of fracture non-unions associated with radiation therapy. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82:544-54.
- 161. Damron TA, Sim FH, O'Connor MI, et al: Ewing's sarcoma of the proximal femur. *Clin Orthop Rel Res* 1996;322:232-44.
- 162. Scully SP, Temple HT, et al: The role of surgical resection in pelvic Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1995;13:2336-41.
- 163. Evans RG, Nesbit ME, et al: Multimodal therapy for the management of localized Ewing's sarcoma of pelvic and sacral bones: a report from the second Intergroup Study. *J Clin Oncol* 1991;9:1173-80.
- 164. Frassica FJ, Frassica DA, Pritchard DJ, et al: Ewing's sarcoma of the pelvis. *J Bone Joint Surg* 1993;75-A:1457-65.

Μεταστατικό σάρκωμα Ewing

165. Paulusen M, Ahrens S, et al: Primary Metastatic (Stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. *Ann Oncol* 1998;9:275-281.
166. Pickerton CR, et al: Treatment strategies for Metastatic Ewing's sarcoma. *European J Cancer* 37(2001):1338-1344.

Υποτροπιάζουσα νόσος σαρκώματος Ewing

167. Klingebiel T, et al: Treatment of children with relapsed soft tissue sarcoma: Report of the German CESS/CWSREZ 91 trial. *Med Pediatr Oncol* 1998;30:269-75.
168. Carlos RG, Catherine AB, et al: Survival after recurrence of Ewing tumours. The St. Jude Children's Research Hospital Experience 1979-1999. *Cancer* 2002; 94(2):561-9.
169. Shankar AG, et al: Local therapy and other factors influencing site of relapse in patient with localized Ewing's sarcoma. *Europ J Cancer* 1999;35(1):698-704.
170. Barbieri E, Emiliani E, et al: Combined therapy of localized Ewing sarcoma of bone: analysis of results in 100 patients. *Int J Radiat Biol Phys* 1990;19:1165-70.
171. Ozaki T, Hilmann A, et al: Significance of surgical margin on the prognosis of patients with Ewing's sarcoma. *Cancer* 1996;78:892-900.
172. Jurgens H, Exner U, et al: Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone. *Cancer* 1988;61:23-32.
173. Ladenstein R, Lasset C, et al: Impact of megatherapy in children with high risk Ewing's tumours in complete remission: a report from the EBMT Solid Tumor Registry. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:697-705.
174. Saylors RL, Stine KC, et al: Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumours: a Paediatric Oncology Group (POG) Phase II Study (abstract). *J Podiatry Oncol* 199;21:332.

Νέοι ορίζοντες θεραπείας

175. Kushner BH, Meyers PA.:How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/ primitive Neuroectodermal tumor Metastatic to bone or bone marrow? The memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol* 2001;19:870-80.
176. Burdach S, et al: Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced ewing tumors: an update after long term follow-up from two centres of the European Intergroup Study EICESS. Stem cell transplant Programmes at Dusseldorf University Medical Centre, Germany and St.Anna Kinderspital, Vienna Austria. *Ann Oncol* 2000;11:1451-62.
177. Scotlandi K, BaldiniN, et al: CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumours. *Cancer* 2000; 60:5134-42.

178. Sohn HW, Choi EY, et al: Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin- independent pathway in Ewing's sarcoma cells. *Am J Pathol* 1998;153:1937-45.
179. Mackall C, Berzofsky J, Helmann LJ: Targeting tumor specific translocations in sarcomas in paediatric patients for immunotherapy. *Clin Orthop* 2000;2000:25-31
180. Sanseau J, Hiscott J, et al: IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IFR-1 and activation of caspase-7. *Oncogene* 2000; 19:3372-83.
181. Fulda S, Jeremias I, et al: Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of Neuroectodermal tumours. *Klin Pediatr* 1999;211:319-322.
182. Toretsky JA, Thakar M, et al: Phosphoinositide 3-hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewing's sarcoma family of tumours. *Cancer Res* 1999;59:5745-50.
183. Kim JS, Pirnia F, et al: Lovastatin induces apoptosis in a primitive Neuroectodermal tumor cell line in association with RB-down regulation and loss of the G1 checkpoint. *Oncogene* 2000; 19:6082-90.
184. Girnita L, Wang M, et al: Inhibition of N-linked glycosylation down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills Ewing's sarcoma cells: therapeutic implications. *Anticancer Drug Des* 2000;15:67-72.
185. Mitsiades N, Poulaki V, et al: Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1678-84.
186. Landuzzi L, De Giovanni C, et al: The Metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am J Pathol* 2000;157:2123-31.
187. Sturla LM, Westwood G, et al: Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2000;60:6160-70.
188. Suid AK, Fahey RC, et al: WR-2721 (amifostine) infusion in patients with Ewing's sarcoma receiving Ifosfamide and Cyclophosphamide with MESNA: drug and thiol levels in plasma and blood cells. A Paediatric Oncology Study Group Study. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44:498-504.
189. Maschan AA, Kopossov PV, et al: A pilot trial of docetaxel in previously untreated children with solid tumours (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:2331.
190. Hurwitz CA, Relling MV, et al: Phase I trial of Paclitaxel in children with refractory solid tumours. A Paediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1993; 11:2324-9.
191. Saylors 3rd RL, Stine KC, et al: Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumours: a Paediatric Oncology Group Phase II Study. *J Clin Oncol* 2001; 19(15): 3463-9.
192. Balis FM. Phase I study of Doxorubicin HCl liposome in paediatric patients with refractory solid tumours (NCI-99-C-0039D, LIPO-NCI-99-C-0039, NCI-99-C-0039) [online]. Available from [URL:http://cancernet.nci.nih.gov/](http://cancernet.nci.nih.gov/) [Assessed 2001 October 17].

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Απόπτωση

193. Cohen JJ, Duke RC, et al: (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10:267-293.
194. Beaulaton J, Locksin RA (1982): The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification. *Int Rev Cytol* 79:215-235.
195. Hoffmann B, Liebermann DA (1994): Molecular controls of apoptosis differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene* : 1807-1812.
196. Korsmeyer SJ.: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80:879-886, 1992.
197. Schwartzmann RA, Gidlowski JA (1993). Mechanism of tissue specific Induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology* 133:591-599.
198. Weedon D, Searle J, Kerr JF (1979) : Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol* 1:133-144.
199. Kerr JF. (1971): Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105:13-20.
200. Ueda N, Shah SV (1994): Apoptosis. *J Lab Clin Med* 124:169-177.
201. Raff MC, Barres BA, et al (1993): Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700.
202. Roy C, et al (1992): The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp Cell Res* 200:416-424.
203. Lam M, et al (1994): Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6569-6573.
204. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M (1991): Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 56:170-77.
205. Rubin LL, Gathalian CL, Rimon G, Brooks SF. (1994) the molecular mechanisms of neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 4:696-702.
206. King KL, Gidlowski JA (1995): Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* 58:175-180.
207. Lotem J, Sachs L. (1995): Regulation of bcl-2, bcl-XL and bax in the control of apoptosis by haematopoietic cytokines and dexamethasone. *Cell Growth Differ* 6: 647-653.
208. Lowe SW, Schmitt EM, et al (1993): p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-849.
209. Bissonnette RP, Echeverri F, et al (1992): Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359:552-554.
210. Sudda T, Nagata S (1994) : Purification and characterization of the fas- ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 179:873-79.
211. Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.

212. Ko I.J AND Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes and Development* 1996,10,1054-1072.
213. McConkey DJ, et al: Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukaemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *Journal of Immunology* 1996, 156,2624-2630.
214. Dewey CW, Ling CC, and Meyn RE.: Radiation induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Intl J Radiat Oncol Biol Phys* 1995,33,781-796.
215. Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, Canistra S: Radiation –induced apoptosis is not enhanced by expression of either p53 or BAX in SW626 ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997,14,2753-2758.
216. Meyn RE.: Apoptosis and response to radiation: implications for radiation therapy. *Oncology* 1977, 11,349-356.
217. Sakakura C, et al: Overexpression of BAX sensitises human breast cancer MCF-7 cells to radiation induced apoptosis. *International J Cancer* 1996, 67,101-105.
218. Bosman FT, Visser BC, Oeveren van J.: Apoptosis: Pathophysiology of Programmed Cell Death. *Path Res Pract* 192,676-683,(1996).
219. Herrero MT, Perez-Otano I, et al (1993): GM-1 ganglioside promotes the recovery of surviving midbrain dopaminergic neurons in MPTP-treated monkeys. *Neuroscience* 56: 965-972.
220. Roederer M, Staal FJ, Ela SW, et al (1993): N-acetylcysteine: potential for AIDS therapy. *Pharmacology* 46: 121-129.
221. Clement MV, Stamencovich I (1994): Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. *J Exp Med* 180:557-567.

Οι Πρωτεΐνες Θερμικού σοκ 70 (Heat Shock Proteins 70)

222. Dura J.M 1981. Hsp synthesis is induced only after treatment at blastoderm and later stages of development. *Mol.Gen.Genet.*184:73-79.
223. Nover L. ed. 1984. Heat shock response of eukaryotic cells,pp.7-10.Springer-Verlag,Berlin.
224. Morimoto R., Tissieres A., Georgopoulos K. in *Stress proteins in Biology and Medicine*, ppl-34.Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
225. Clarke, A.R (1996) Molecular chaperones in protein folding and translocation. *Curr.Opin.Struct.Biol.*6, 43-50.
226. Parcel DA and Lindquist S. (1993) The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27,437-496.
227. Hightower L.E. et al. (1993). Interactions of vertebrate Hsc70 and Hsp70 with unfolded proteins and peptides. Pp.179-208, Cold Spring Harbor.
228. Gething M.J et al. (1995). Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 60, 417-428.
229. Rudiger S. et al.(1997) Interaction of HSP70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* 4,342-349.
230. Palleros D.R. et al (1994) Hsp70 protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J.Biol.Chem.* 269, 13107-13114.
231. Demand J. et al. (1998) The carboxy-terminal domain of Hsp70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol Cell Biol.* 18, 2023-2028.

232. Gerner EW, and Schneider M.J. (1975) Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* 256, 500-502.
233. Li G.C. and Werb Z. (1982) Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3218-3222.
234. Mosser DD and Martin L.H (1992) Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. *J. Cell. Physiol.* 151, 561-570.
235. Creagh E.M. et al (2000) Heat shock protein 70 inhibits caspase –dependent and –independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp. Cell. Res.* 257, 58-66.
236. Nylandsted J. et al. (2000) Selective depletion of Heat Shock Protein 70 (HSP70) activates a tumor specific death program that is independent of caspase and bypasses Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 7871-7876.
237. Gabai V.L. et al.(2000) Hsp72 mediated suppression of c-Jun N-terminal Kinase is implicated in development of tolerance to caspase independent cell death. *Mol. Cell. Biol.* 20,6826-6836.
238. Samali A, and Orrenius S, (1998) Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 3, 228-236.
239. Wolf B. and Green D.R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem*, 274,20049-20052.
240. Green D.R and Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
241. Gross A. et al. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13,1899-1911.
242. Beere H.M. et al (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2, 469-475.
243. Saleh A. et al (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* 2,476-483.
244. Li C.Y. et al (2000) Heat Shock Protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation *J.Biol.Chem.* 275, 25665-25671.
245. Liu X. et al (1996) Induction of apoptotic program in cell free extracts: recruitment for d ATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
246. Jaatela, M. et al (1998) Hsp70 exerts its apoptotic function downstream of caspase –3 like proteases. *EMBO J* 17,6124-6134.
247. Mosser D.D. et al. (2000) The chaperone function of Hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 20,7146-7159.
248. Benedict M.A. et al (2000) Expression and analysis of Apaf-1 isoforms. Extra WD-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J.Biol Chem.* 275,8461-8468.
249. Pandey P. et al (2000) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase –9 by Heat Shock Protein 90. *EMBO J.* 19,4310-4322.
250. Beere H.M. and Green D. (2001) Stress management-heat shock protein 70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 11,6-10.
251. Tournier C. et al (2000) Recruitment of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288,870-874.
252. Yamamoto K. et al (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK 1/ Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol.Cell Biol.* 19,8469-8478.

253. Liossis S.N. et al (1997) Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J.Immunol.* 158, 5668-5675.

H p53

254. Varmus H, Weinberg RA: Genes and the biology of cancer. New York, Scientific American Library, 1993, pp67-120.
255. Harlow E: An introduction to the puzzle. In *The molecular Genesis of Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, pp709-723.
256. Bishop JM: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248,1991.
257. Knudson AG: Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10914-10921,1993.
258. Hollstein M, Sindransky D, Vogelsteinn B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991, 253: 49-53.
259. Greenblatt MS, Bennett WP, Holstein M: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer aetiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-4878,1994.
260. El Deiry WS, Kern SE, et al.: Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1992, 1: 45-49.
261. Funk WD et al.: A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol.* 1992, 12: 2866-2871.
262. Beaudry GA, Bertelsen AH, Sherman MI: Therapeutic targeting of the p53 tumor suppressor gene. *Curr Opin Biotechnology* 1996, 7: 592-600.
263. Pietenpol JA, et al.: Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:1998-2002.
264. Lane DP: p53, guardian of the genome. *Nature*1992,358:15-16.
265. Miller CW, Aslo A, et al.: Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma. *Cancer Res.* 50: 7950-7954,1990.
266. Andreassen A, et al: p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res* 53:468-471,1993.
267. Smith Sorensen B, Gebhardt MC, et al: Screening for TP53 mutations in osteosarcomas using constant denaturant gel electrophoresis (CDGE) *Hum Mutat* 260: 274-285,1993.
268. Momand J, Zambetti GP, et al: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245,1992.
269. Ladanyi M, Cha C, et al.: MDM2 Gene Amplification in Metastatic Osteosarcoma. *Cancer Res* 53:16-18,1993.
270. Leach FS, et al.: P53 mutation and mdm2 amplification in human soft tissue sarcomas.. *Cancer Res* 53:2231,2234,1993.
271. Cordon-Cardo C, et al.: Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54: 794-799,1994.
272. Smith SH, Weiss SW, et al.: SAS amplification in soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 52: 3746-3749,1992.
273. Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ: Induction of cellular p53 activity by DNA – damaging agents and growth arrest. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 4242-4250.

274. Graeber TJ, Osmanian C, et al.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996, 379:88-91.
275. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ.: Progression from lymphoid hyperplasia to high grade malignant lymphoma in mice transgenic for (t-14/18). *Nature*,349:254-256,1991.
276. Slinchenmeyer WI, et al.: Loss of a p53 –associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res.*, 53:4164-4168,1993.
277. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housmann DE.: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993,74:954-967.
278. El Deiry WS, et al.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 54: 1169-1174,1994.
279. Cross SM, et al.: p53 –dependent mouse spindle checkpoint. *Science* ,267: 1353-1356,1995.
280. Stewart N, et al: Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*, 10:109-115,1995.
281. Weinert TA, Hartwell LH.: The rad9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*,241:317-321,1988.
282. Rowley R: Reduction of radiation-induced G2 arrest by caffeine. *Radiat. Res* ,129:224-227,1992.
283. Powell SN, et al.: Differential sensitivity of p53 and p53+ cells to caffeine-induced radiosensitisation and override of G2 delay. *Cancer Res* .55:1643-1648,1995.
284. Russel KJ, et al.: Abrogation of G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 –deficient and G1 checkpoint –competent cells. *Cancer Res.*, 55:1639-1642,1995.
285. Chiarugi V, and Ruggiero M.: Role of three cancer “master genes” p53, Bcl2 and c-myc on the apoptotic process. *Tumori*, 82: 205-209,1996.
286. Smith ML. et al.: Interaction of the p53 –regulated protein Gadd 45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, 266: 1376-1380, 1994.
287. Komuro H, et al.: Mutation of the p53 gene are involved in Ewing’s sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Res.*, 53: 5284-5288,1993.
288. Hamelin R, et al.: p53 mutations in human tumours with chimeric EWS/FLI1 genes. *Int J Cancer* 57:336-340,1994.
289. Kovar H. et al.: Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in Ewing tumours. *Oncogene* 8: 2683-2690,1993.
290. Ladanyi M, et al.: MDM2 and CDK4 gene amplification in Ewing’s sarcoma. *J. Pathol* 175:211-217,1995.
291. Yonk-koo Park, Sung Gil Chi, Youn-Wha Kiim, Hye-Rim Park and Unni KK: p53 mutations in Ewing’s sarcoma. *Oncology Res* 8: 533-537,2001.
292. Abudu A. et al.: Overexpression of p53 protein in primary Ewing’s sarcoma of bone: relationship of tumour stage, response and prognosis. *Br J Cancer* 79: 1185-1189,1999.
293. Lowe SW.et al.: Apoptosis and the prognostic significance of p53 mutation. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 1994, 59:419-426.
294. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K: Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995, 13_ 1009-1022.
295. Kaufmann SH: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukaemia cells, by Etoposide, camptothecin and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 1989, 49:5870-5878.

296. Bracey TS, Miller JC, Preece A, Paraskevas C: γ -radiation induced apoptosis in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines can occur in the absence of wild type p53. *Oncogene* 1995, 10: 2391-2396.
297. Liu TJ, et al.: Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1995, 55:3117-3122.
298. Lesoon-Wood LA, et al.: Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastasis of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum Gene Ther* 1995, 6: 395-405.
299. Zhang WW, et al.: Safety evaluation of Ad5CMV-p53 in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 1995, 6:155-164.
300. Fujiwara T, et al.: Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res* 1994, 54: 2287-2291.
301. Roth JA: Modification of tumor –suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expressing wild-type p53 and cisplatin. *Human Gene Ther* 1996, 7: 1013-1030.
302. Niewolik D, Vojtesek B, Kovarik J: P53 derived from human tumor cell lines and containing distinct point mutations can be activated to bind its consensus target sequence. *Oncogene* 1995, 10:881-890.
303. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM: Down-regulation of bcl2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994, 54:2095-2097.
304. Miyashita T, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995, 80: 293-299.
305. Wiedenfeld EA, et al.: Evidence for selection against human lung cancers bearing p53 missense mutations which occur within the HLA A*0201 peptide consensus motif. *Cancer Res* 1994, 54:1175.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

306. De Alava E. et al.: Prognostic impact of p53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 89 (4): 783-792, 2000.
307. Bankfalvi A, Navabi H, et al.: Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunochemistry. *Pathol* 174:223-229,1994.
308. Trieb K, et al.: Do heat shock proteins play a role in Grave's disease? Heat shock protein specific T cells from Grave's disease do not recognise thyroid epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 77:528-535, 1993.
309. Trieb K, et al.: Heat shock protein 72 expression in Osteosarcomas correlates with good response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Hum Pathol* 29 (10): 1050-1055, 1998.
310. Llombart Bosch A, Blache R, et al: Histopathological predictive factors in Ewing's sarcoma of bone and clinicopathological correlations: a retrospective study of 261 cases, *Virchows Arch [A]* 409:627-640,1986.

311. Gobel V, et al.: Prognostic significance of tumor volume in localized Ewing's sarcoma of bone in children and adolescents. *J Cancer Res Clin Oncol* 113:187-191,1987.
312. Sluga M, et al.: A long-term review of the treatment of patients with Ewing's sarcoma in one institution. *EJSO* 2001; 27: 569-573.
313. Galindo-Rondriguez C, et al.: Survival after recurrence of Ewing tumors. *Cancer* 94(2): 561-569,2002.
314. Welch W.: Mammalian stress response:Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-1081, 1992.
315. Lamb J, Bal B, Mandez-Samperio P: Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1: 191-195,1989.
316. Udono H, Srivastava P: Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 178: 1391-1396,1991.
317. Lazaris AC, et al.: Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Research and Treatment*, 00: 1-9,1996.
318. Kamishima T, et al.: Carcinosarcoma of the urinary bladder: expression of epithelial markers and different expression of heat shock proteins between epithelial and sarcomatous elements. *Pathol Int* 1997; 47(2-3): 166-173.
319. Koomagi R, et al.: Expression of resistance – related proteins in tumoral and peritumoral tissues of patients with lung cancer. *Cancer Lett* 20; 110(1-2): 129-136,1996.
320. Patel B, et al.: Hypoxia induces HSP70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells. *Biochem Mol Biol Int* 36(4): 907-912,1995.
321. Lazaris AC, et al.: Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 38(7): 739-745,1995.
322. Multhoff G: Heat shock protein 72 (HSP 72), a hyperthermia – inducible immnogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's sarcoma cells. *Int J Hyperthermia* 13(1): 39-48,1997.
323. Ciocca DR, et al.: Heat shock protein hsp 70 in patients with axillary lymph node – negative breast cancer: Prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85(7): 570-574,1993.
324. Lehmann T, Bennett WP, Metcalf RA: P53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 51:4090- 4096,1991.
325. Mivechi NF, Quyang H, Monson JM, Hahn GM: Correlation of heat resistance and HSP –70A m RNA levels in human tumor cells measured by competitive quantitative polymerase chain reaction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30(1): 141-149,1994.
326. Lieu FF, et al.: The potential role of HSP 70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *Int J Hyperthermia* 12(2): 197-208,1996.
327. Wei Y, et al.: Induction of autologous tumor killing by heat treatment of fresh human tumor cells: involvement of gd T cells and heat shock protein 70. *Cancer Res* 56: 1104-1110,1996.
328. Multhoff G, et al.: Heat shock protein 72 on tumor cells. *J Immunol* 158: 4341-4350,1997.

329. Trieb K. et al.: Human osteosarcoma infiltrating lymphocytes recognize the heat shock protein 72. *Trans Orthop Res Soc* 22: 561,1997.
330. Multhoff G, et al.: A stress – inducible 72- kDa heat shock protein (HSP 72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 61(2): 272-279,1995.
331. Levine AJ: P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997;88: 323-31.
332. El Deiry WS, et al.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 54: 1169-1174,1994.
333. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ.: Progression from lymphoid hyperplasia to high grade malignant lymphoma in mice transgenic for (t-14/18). *Nature*,349:254-256,1991.
334. Mangham D, et al.: P53 overexpression in Ewing's sarcoma / primitive Neuroectodermal tumor is an uncommon event. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1995; 48: M79-82.
335. Iwadate Y, et al.: Mutation of the p53 in human astrocytic tumors correlates with increased resistance to DNA – damaging agents but not to anti – microtubule anti-cancer agents. *Br J Cancer* 1998;77: 547-551.
336. Safran H, et al.: P53 mutations do not predict response to paclitaxel / radiation for non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 1996; 78:1203-10.
337. Wahl AF, et al.: Loss of normal p53 function confers sensitisation to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nature Med* 1996; 2:72-9.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Εικόνα 1. Αρνητική χρώση σαρκώματος Ewing για p53. Παντελής έλλειψη χρώσης των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων. Μεγέθυνση 250X.

Εικόνα 2. Ελαφρά χρώση σαρκώματος Ewing για p53. Οι χρωματισμένοι πυρήνες αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 20% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων, άσχετα εάν η κυτταροπλασματική χρώση εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων. Μεγέθυνση 450X.

Εικόνα 3. Έντονη χρώση σαρκώματος Ewing για p53. Ο αριθμός των πυρήνων των κυττάρων του νεοπλάσματος που χρωματίζεται έντονα θετικά, ξεπερνάει το 70% του συνολικού πληθυσμού τους. Μεγέθυνση 250X.